Entwicklung, Aufbau und Anwendung einer Syntheseapparatur für die Liquid-Phase-Peptidsynthese

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Ulrich Heitmann

aus Beckum

1978

Entwicklung, Aufbau und Anwendung einer Syntheseapparatur für die Liquid-Phase-Peptidsynthese

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften dem Fachbereich Chemie der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Ulrich Heilmann
aus Bocholt

1978

Entwicklung, Aufbau und Anwendung einer Syntheseapparatur für die Liquid-Phase-Peptidsynthese

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Ulrich Heitmann

aus Beckum

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Mai 1978

Dekan:	Prof. Dr. W. Zeil
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Voelter

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1975 bis November 1977 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen durchgeführt.

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Ernst Bayer, danke ich für die Stellung des Themas, für sein stetes Interesse und für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0081

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.	Die klassische Peptidsynthese	2
2.	Die Festphasenmethode	2
3.	Der lösliche Polystyrolträger	4
4.	Die Liquid-Phase-Methode	4
5.	Die Fest-Flüssig-Phasen-Methode	7
II.	PROBLEMSTELLUNG	8
III.	DIE DURCHFÜHRUNG	9
1.	Das Synthesegerät nach dem Rotationskolben	9
1.1.	Das Reaktionsgefäß	11
1.2.	Der Antrieb	13
1.3.	Das Gegenlager	14
1.4.	Die Schwenkeinrichtung	18
1.5.	Die Heizung und Kühlung	19
1.6.	Die Reagentien und Lösungsmittelzugaben	19
2.	Die Peptidsynthesen mit dem Synthesegerät	21
2.1.	Die Synthese der Insulin-A-Kette	21
2.1.1.	Die Wahl der Schutzgruppen und Kupplungsmethoden	23
2.1.2.	Die Synthese der Insulin-A-Sequenz 21-15 in dem Synthesegerät	24
2.1.3.	Manuelle Weiterführung der Synthese	25
2.1.4.	Die Aufarbeitung und Charakterisierung der Insulin-A-Kette	27
2.2.	Die Synthese eines Pentapeptids der Sequenz His-Phe-Phe-Val-Gly OH in dem Synthesegerät	28
2.2.1.	Syntheseplan und Schutzgruppenwahl	28

2.2.2. Durchführung der Synthese und Beobachtungen zum Syntheseverlauf 28
2.2.3. Die Abspaltung und Charakterisierung des Peptids 30

3. Das Synthesegerät nach dem alternierenden Druckprinzip 30
3.1. Prinzipielle Überlegungen und Vorversuche 30
3.2. Der erste Prototyp und Vorversuche 33
3.2.1. Die Synthese eines Tetrapeptids der Sequenz Ala-Gly-Leu-Ala 36
3.2.2. Durchführung der Synthese und Beobachtungen zum Syntheseverlauf 37
3.2.3. Die Abspaltung und Charakterisierung des Peptids 38

3.3. Der zweite Prototyp und Vorversuche 38
3.3.1. Die Synthese der Insulin-A-Kettensequenz 21-16 40
3.3.2. Die Abspaltung und Charakterisierung des Peptids 42

3.4. Der 3. Prototyp 43
3.4.1. Beschreibung des Reaktionsgefäßes 43
3.4.2. Vorversuche mit dem Synthesegerät 46
3.4.3. Die Synthese eines Oktapeptids 47
3.4.4. Die Aufarbeitung des Polymerpeptids 50
3.4.5. Die Bromcyan-Abspaltung 50
3.4.6. Die alkalische Abspaltung 50
3.4.7. Die Hydrazynolyse 50

3.5. Die Automatisierung des Synthesegerätes 51
3.5.1. Die Wahl der Magnetventile 51
3.5.2. Multiportventil 52
3.5.3. Das Steuergerät 53
3.5.4. Aufbau der Apparatur 53
3.5.5. Die Synthese eines Tetrapeptids der Sequenz H-Gly-Phe-Val-Ala-OH 57

3.5.6. Die Abspaltung und Charakterisierung des Peptids 59

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE 60

1. Das Synthesegerät nach dem Rotationskolbenprinzip 60
2. Das Synthesegerät nach dem alternierenden Druckprinzip 62
3. Die Gegenüberstellung und der Vergleich der beiden Synthesegeräte 63
4. Die Synthese der Insulin-A-Kette 64

V. EXPERIMENTELLER TEIL 66

1. Abkürzungen 66
2. Verwendete Geräte 67
3. Chemikalien und Lösungsmittel 68
4. Aminosäurederivate 68
5. Allgemeine Arbeitsverfahren 69
5.1. Aminosäureananlyse 69
5.2. Dünnschichtchromatographie 69
5.3. Aktivierung der N-Boc-Aminosäuren 70
5.4. Die Kupplung 70
5.5. Die Boc-Abspaltung 71
6. Synthese der $Ala^{18,21}$-Insulin-A-Kette 71
6.1. Veresterung von PEG_{20} mit Boc-Ala 71
6.2. Stufenweise Synthese der Insulin-A-Kette 71
6.3. Hydrolyse des Peptidesters 75
6.4. Abspaltung der O-Benzylschutzgruppen 75
6.5. Gemeinsame Reduktion der Tetra-S-Benzyl-A-Kette mit der Dithiosulfat-B-Kette 77
6.6. Rekombination der reduzierten Kette 77
6.7. Charakterisierung des Rekombinats 78

7.	Synthese eines Pentapeptids der Sequenz H-His-Phe-Phe-Val-Gly-OH	81
7.1.	Veresterung von PEG_{30} mit Boc-Gly	81
7.2.	Stufenweiser Aufbau des Peptids	81
7.3.	Alkalische Hydrolyse des Peptidesters	84
7.4.	Charakterisierung des Peptids	85
8.	Synthese eines Tetrapeptids der Sequenz H-Ala-Leu-Gly-Ala-OH	85
8.1.	Veresterung von PEG_6 mit Boc-Ala	85
8.2.	Stufenweise Synthese des Peptids	85
8.3.	Alkalische Hydrolyse des Peptidesters	88
8.4.	Charakterisierung des Peptids	88
9.	Synthese der Insulin-A-Sequenz Ala^{21}-Leu^{13}	89
9.1.	Veresterung von PEG_{20} mit Boc-Ala	89
9.2.	Stufenweiser Aufbau des Peptids	89
9.3.	Alkalische Hydrolyse des Peptidesters	92
10.	Synthese eines Oktapeptids der Sequenz PEG_{20}-Ala-Met-Asn-Cys(SIP)-Tyr(Bzl)-Asn-Glu(Bzl)-Leu-H	92
10.1.	Veresterung von Boc-Ala mit PEG_{20}	92
10.2.	Stufenweiser Aufbau des Peptids	92
10.3.	Die Bromcyan-Spaltung	96
10.4.	Die Alkalische Hydrolyse	98
10.5.	Die Hydrazinolyse	99
11.	Synthese eines Tetrapeptids der Sequenz H-Gly-Phe-Val-Ala-OH an einer säurelabilen Ankergruppe	99
11.1.	Synthese des Bis(p-Brommethylbenzoyl)-polyäthylenglykols	99
11.2.	Veresterung der Ankergruppe mit Boc-Ala	99
11.3.	Stufenweiser Aufbau des Peptids	100
11.4.	Abspaltung des Peptids	101
11.5.	Charakterisierung des Peptids	102

VI. ZUSAMMENFASSUNG 103

VII. LITERATURVERZEICHNIS 105

LEBENSLAUF 111

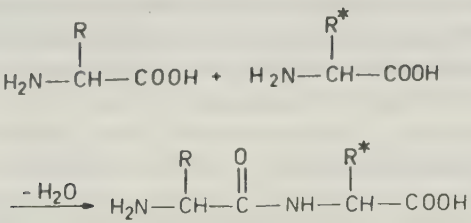
I. EINLEITUNG

Aminosäuren sind als Bausteine von Peptiden und Proteinen ebenso wie die Nucleinsäuren grundlegend an allen Lebensvorgängen beteiligt. Peptide sind aus zwei oder mehreren Aminosäuren bestehende Verbindungen, in denen diese säureamidartig miteinander verknüpft sind. Zu dieser Verbindungsklasse gehören eine große Anzahl von Polypeptidhormonen und -antibiotika.

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Methoden der Peptidsynthese entwickelt. Durch die Synthese kann der Beweis für die richtige Konstitution eines Peptids geführt werden. Die Modifizierung der Aminosäuresequenz während der Synthese kann wichtige Hinweise auf die Struktur und Wirkung der biologisch aktiven Peptide geben. So wurden auch schon Peptide gefunden, die eine höhere biologische Wirkung als ihre natürlichen Analoga haben.

Die Grundreaktion bei der Peptidsynthese ist die Knüpfung der Peptidbindung (Abb. 1).

Abb. 1



An den Reaktionsverlauf müssen folgende Bedingungen gestellt werden:

Er muß eindeutig sein. Man muß diejenigen Amino-, Carboxyl- und andere funktionelle Gruppen schützen, die nicht an der Reaktion teilnehmen sollen.

Die Reaktion muß racemisierungsfrei sein.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Syntheseprinzipien entwickelt, die in den folgenden Kapiteln kurz beschrieben werden.

1. Die klassische Synthese

Bei der klassischen Synthese werden die beiden Aminosäuren in homogener Lösung miteinander verknüpft. Die Reaktionsausbeute muß nicht 100 % betragen. Das entstandene Dipeptid muß durch Reinigungsoperationen, z.B. Umkristallisation, vom Ausgangsmaterial getrennt werden. Die Dipeptide werden nun durch weitere Reaktionen zu größeren Fragmenten miteinander verknüpft, oder nach Bodansky (1) stufenweise weiter aufgebaut.

Mit wachsender Kettenlänge werden die Reinigungsoperationen nach jedem Schritt aufwendiger. Außerdem nimmt mit der Kettenlänge die Löslichkeit des Peptids stark ab. Durch diese Schwierigkeiten wird die Kettenlänge des zu synthetisierenden Peptids begrenzt.

2. Die Festphasenmethode

Um die obengenannten Nachteile der klassischen Synthese zu umgehen, entwickelte Merrifield 1962 (2,3) eine neue Konzeption der Synthesetechnik. Bei diesem Verfahren wird die erste Aminosäure über eine geeignete Ankergruppe C-terminal an eine unlösliche Matrix gebunden. Als unlös-

liche Matrix werden vernetztes Polystyrol, Phenol-Formaldehyd-Harze (4,5), Pellicullar-Harze (6,80,81,82), Bürstenharze (7) und modifiziertes Sephadex G25 (8) verwandt. Dieses Syntheseverfahren verlangt bei jedem Kupplungsschritt quantitative Reaktionen,unter Ausschluß von Nebenreaktionen an der Peptidkette.
Die im hohen Überschuß eingesetzten aktivierten Aminosäuren können nach erfolgter Reaktion durch einfaches Waschen und Filtrieren wieder entfernt werden. Die einfachen Reinigungsoperationen verringern den Zeitaufwand pro Kupplungsschritt gegenüber der klassischen Synthese beträchtlich. Außerdem erlaubt die Arbeit im heterogenen System die einfache Kontruktion einer "Peptid-Synthese-Maschine". Es wurden verschiedene Reaktionsgefäße und Synthesegeräte konstruiert und entwickelt (9-22).

Wegen der Inhomogenität der Reaktion treten auch große Nachteile auf. Wie von Bayer et.al. (23) gezeigt wurde, ist es unmöglich quantitative Umsätze zu erreichen. Die dadurch entstehenden Fehl- und Rumpfsequenzpeptide lassen sich nicht mehr vom gewünschten Peptid abtrennen. Trotz mangelnder Reinheit der Endprodukte wurde z.B. die Ribonuclease A mit 124 Aminosäuren (24) mit 20%-iger biologischer Aktivität synthetisiert.
Die biologische Aktivität dieser Polypeptidgemische ist jedoch kein Beweis für das Gelingen der Synthese. So zeigte das von C.H. Li und D. Yamashiro (83) synthetisierte Wachstumshormon eine 10%-ige Aktivität, obwohl die der Synthese zugrundeliegende Sequenz aus 188 Aminosäuren nicht stimmte (84).

R.P. Letsinger und M.J. Kornett beschrieben 1963 (25,26) eine Synthesevariante bei der das Peptid vom N-terminalen Ende an einem Popcorn-Copolymerisat aus Styrol und Divinylbenzol aufgebaut wird. Wegen des geringen Vernetzungsgrades ermöglichen diese Polymere eine gute Diffusion. Der Nachteil dieser Methode liegt in der erhöhten Race-

misierungsgefahr bei Aktivierung der Carboxylgruppe und dem Mangel geeigneter Carboxylschutzgruppen.

Eine Mischung zwischen klassischer Synthese und der Festphasensynthese ist die von Katachalski (27) entwickelte Polymerreagenzmethode. Es werden N-geschützte, aktivierte, unlösliche polymere Aminosäurester mit Peptidestern zur Reaktion gebracht. Der Überschuß wird abzentrifugiert, und das lösliche Peptid fällt bei quantitativer Reaktion rein an.
Auch dieser Methode sind durch die Löslichkeit des Peptids Grenzen gesetzt.

3. Lösliche Polystyrolträger

M.M. Shemyakin und Ya.A. Ovchinnikov et.al. (28) verwendeten ein lösliches Polystyrol MG 200 000 um die Nachteile der Merrifield-Methode zu umgehen. Das Peptid wird vom C-terminalen Ende aufgebaut. Die Überschüsse werden nach jeder Kupplung durch Ausfällen des Polymerpeptids entfernt.

4. Die Liquid-Phase-Methode

Die Liquid-Phase-Methode versucht die Vorteile des klassischen Verfahrens und der Festkörpermethode miteinander zu vereinen, ohne deren Nachteile hinnehmen zu müssen. Dieses von E. Bayer, H.P. Hagenmaier und M. Mutter vorgeschlagene Verfahren (29,30,32) benützt Polyäthylenglykole mit einem Molekulargewicht bis zu 20 000 als lösliche polymere C-terminale Schutzgruppen.

Die Vorteile dieser Schutzgruppe sind:

Alle Reaktionen der Peptidsynthese werden wie beim konventionellen Verfahren in homogener Lösung durchgeführt.

Der Reaktionsablauf ist eindeutig und gleicht in der Kinetik der von Methyl- oder Äthylestern.

Die Kupplungsschritte können analytisch mit den verschiedensten Verfahren leicht verfolgt werden. (33,34,35).

Die niedermolekularen Überschüsse können vom makromolekularen Polymerpeptid leicht durch Ätherfällung aus den verwendeten Lösungsmitteln abgetrennt werden.

Die Synthesetaktik ist nicht eingeschränkt. Alle Schutzgruppen und Kupplungsmethoden können angewandt werden.

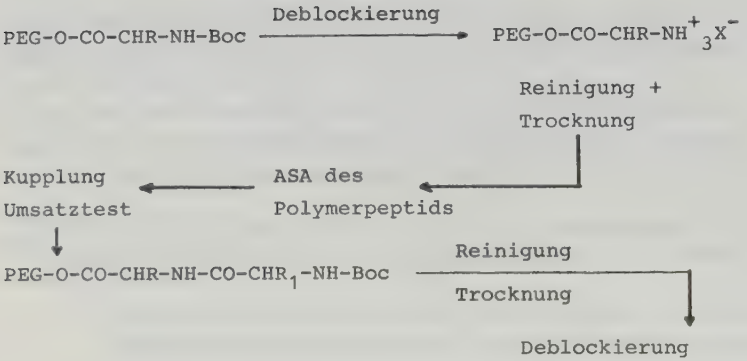
Durch die kurzen Reaktionszeiten und die schnellen Reinigungsoperationen ist der Zeitaufwand gering.

Die erste Aminosäure wird als aliphatischer Peptidester an das Polyäthylenglykol gebunden. Nach Abschluß der Synthese kann das Peptid durch alkalische Hydrolyse, Umesterung, Ammonolyse oder Hydrazinolyse abgespalten werden.

Die C-terminale Aminosäure kann auch als Benzylester (36, 37) an das Polyäthylenglykol fixiert werden. Das Peptid kann dann hydrogenolytisch mit Bromwasserstoff/Trifluoressigsäure oder mittels Flußsäure abgespalten werden.

Für die in dieser Arbeit angewandte Synthesestrategie ergibt sich folgender Reaktionszyklus (Abb. 2):

Abb. 2



a) Deblockierung

Die Abspaltung der Boc-Gruppe erfolgt in einer 10%-igen Lösung des Polymerpeptids in 1,2 n Chlorwasserstoff/Eisessig oder Trifluoressigsäure. Diese Lösung wird je nach Peptid 20 - 40 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Abspaltungsagens wird anschließend am Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert. Der ölige Rückstand wird in Methylenchlorid, Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxyd aufgenommen und mit Diäthyläther gefällt und abfiltriert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Der Niederschlag wird anschließend am Hochvakuum getrocknet.

b) Kupplung

Das deblockierte Polymerpeptid wird in Methylenchlorid, Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxyd gelöst. Zu dieser Lösung gibt man das symmetrische Anhydrid der Aminosäure und neutralisiert die Lösung mit einer äquivalenten Menge an N-Methylmorpholin. Nach 1 - 3 stündigem Rühren wird das Polymerpeptid durch mehrmaliges Umfällen mit Äther

oder Umkristallisation aus Äthanol gereinigt.
Das gereinigte Polymerpeptid wird am Hochvakuum getrocknet.
Der Umsatz wird mittels Fluramtest und Aminosäureanalyse geprüft.
Ein Synthesezyklus dauert je nach Kupplungszeit und Löslichkeit des Polymerpeptids zwischen 6 und 18 h.

5. Die Fest-Flüssig-Phasen-Methode

Eine Kombination der Solid-Phase mit der Liquid-Phase-Methode wurde von H. Hagenmaier (38,39) entwickelt. Bei dieser alternierenden Fest-Flüssig-Phasen-Methode wird die zu kuppelnde Aminosäure am unlöslichen Träger voraktiviert. Dadurch läßt sich die umgesetzte von der nichtumgesetzten Verbindung durch einfache Filtration trennen. Ob sich diese Methode durchzusetzen vermag und auch zur Synthese längerer Peptide geeignet ist, wird die Zukunft erweisen.

II. PROBLEMSTELLUNG

In den vorhergehenden Kapiteln wurden die verschiedenen Strategien der Peptidsynthese kurz beschrieben und gegenübergestellt.
Ziel dieser Arbeit ist die Konstruktion einer automatischen Peptidsyntheseapparatur für die Liquid-Phase-Peptidsynthese. Das zentrale Problem ist die Suche und Prüfung eines geeigneten Reaktionsgefäßes, in dem alle Operationen, die zur Peptidsynthese nach der Liquid-Phase-Methode notwendig sind, durchgeführt werden können. Dieses "Eintopfsystem" ist im Labor und Halbtechnikum jedem "Mehrtopfsystem" vorzuziehen, da die Kontaminationsgefahr beim Hin- und Herpumpen der Reaktionslösung zwischen zwei oder drei Gefäßen sehr groß ist. Es ist also notwendig, ein Gefäß zu finden, in dem alle klassischen Laboroperationen wie Lösen, Fällen, Filtrieren, Destillieren und Trocknen möglich sind.

Ein von G. Holzer (40) entwickeltes System soll ausgebaut werden. Gleichzeitig werden auch andere Automationsmöglichkeiten geprüft und gegebenenfalls weiterentwickelt.

Die Leistungsfähigkeit der Reaktionsgefäße soll durch die Synthese unterschiedlicher Modellpeptide bewiesen werden. Weiterhin wird versucht, die unterschiedlichen Systeme, soweit als möglich, auf ihre Automatisationsfähigkeit zu testen. Die bei der Entwicklung der Syntheseapparatur auftretenden Probleme und der Versuch ihrer Lösung werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

III. DIE DURCHFÜHRUNG

1. Das Synthesegerät nach dem Rotationskolbenprinzip

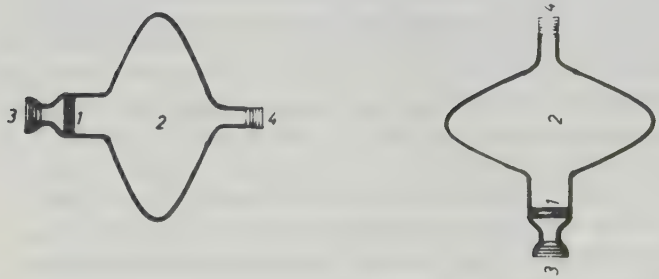
Dieses von G. Holzer konzipierte Reaktionsgefäß (40) sollte in dieser Arbeit weiterentwickelt und auf seine Automatisierungsmöglichkeiten getestet werden.

G. Holzer schlug einen Kolben vor, dessen Boden durch eine Fritte ersetzt ist (Abb. 3).

Durch beide Kolbenöffnungen können Lösungsmittel und Reagentien in das Reaktionsgefäß gepumpt werden. Während der Reaktion befindet sich das Gefäß in horizontaler Lage und wird durch einen Rotationsverdampfermotor gedreht. Durch die Drehbewegung wird die Reaktionslösung durchmischt und die Kolbenwand gleichmäßig mit Lösungsmittel benetzt. So wird eine vollkommene Homogenisierung des Reaktionsgemisches erreicht. Überschüssiges Lösungsmittel kann durch Erwärmen des Kolbens und Anlegen eines Vakuums an die obere Öffnung problemlos abdestilliert werden.
Nach Ausfällen des Polymerpeptids wird der Kolben um 90° in die vertikale Lage gedreht, und durch Anlegen eines Vakuums an die Fritte wird der Niederschlag abfiltriert.

G. Holzer verwandte als Reaktionsgefäß einen 2l-Einhalskolben NS 29, dessen Mitte gestaucht und dessen unteres Ende konisch ausgezogen war (Abb. 3).

Abb. 3: 1 Fritte, 2 Reaktionskolben, 3 Kugelschliff zum Gegenlager, 4 NS 29 zum Antrieb



horizontal vertikal

Die obere Öffnung ist an das Gasdurchführungsrohr eines Rotationsverdampfers (Büchi Rotavapor R) angeschlossen. Die untere Öffnung, das Gegenlager, sitzt als Kugelhülse auf einem feststehenden Teflonkern. Auf die andere Seite des Teflonkerns ist ein Ansatz gesteckt, der eine Ableitung für das Filtrat und Zuleitungen für Druck und Lösungsmittel enthält.
Die ganze Apparatur ist in ein schwenkbares Achsenkreuz gespannt.
Diese Versuchsanordnung hat folgende Nachteile:

a) Die Kolbenform macht glastechnisch eine genaue Zentrierung der Kolbenachse unmöglich. Außerdem ist ein Lateralversatz der Achse nur schwer zu vermeiden. Diese beiden Konstruktionsmängel bewirken während der Rotation ein "Eiern" des Kolbens.
Die daraus resultierenden Torsions- und Biegezugspannungen bedeuten eine wesentlich erhöhte Bruchgefahr während des Betriebes.

b) Außerdem hat das Kugelschlifflager nicht die erforderliche Vakuumdichtigkeit.

c) Der Antriebsmotor ist nicht drehzahlkonstant. Die Drehzahl ist abhängig von den Druckverhältnissen im Innern des Kolbens.

d) Die Verbindung des Reaktionsgefäßes mit dem Antrieb mittels eines NS-Kegelschliffes ist ebenfalls problematisch, da einerseits die Vakuumdichtigkeit des Übergangs nur durch gutes Einfetten erreicht wird, andererseits aber die Übertragung des Drehmoments vom Antrieb auf das Gegenlager des Kolbens wegen mangelnder Haftreibung gehindert ist.

1.1. Das Reaktionsgefäß

Wegen der schon beschriebenen technischen Mängel wurde versucht, das Reaktionsgefäß so umzukonstruieren, daß diese Fehler so weit als möglich ausgeschlossen werden. An das Gefäß müssen folgende Bedingungen gestellt werden:

a) Der Kolben muß druckfest sein (min. 2 bar)

b) Er soll schnell und einfach vom Glasbläser aus genormten Einzelteilen hergestellt werden und bei kleineren Schäden auch leicht reparierbar sein.

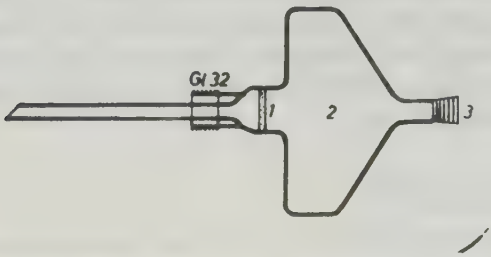
c) Der Lateralversatz der Achse muß so gering wie möglich sein.

d) Das Verhältnis Länge/Volumen muß möglichst klein sein. Das Gefäß soll mindestens ein Fassungsvermögen von 1,5 l haben.

e) Die Übergänge vom Antrieb zum Gegenlager sollen sich leicht herstellen lassen, vakuumdicht sein und das Drehmoment des Antriebs gut übertragen.

Die ideale Gefäßform nach Bedingung d) wäre ein elliptischer Kolben, der um seine kürzere Halbachse rotiert. Da aber solche Kolbenrohlinge nicht käuflich sind, mußte versucht werden auf ähnliche Kolbenformen auszuweichen. Als Ausweg bot sich ein besonders dickwandiger Fernbachkolben an (Abb. 4).

Abb. 4: 1 Fritte, 2 Fernbachkolben, 3 NS 29 zum Antrieb

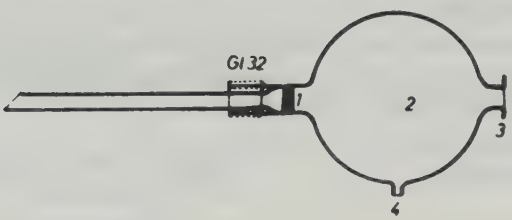


Wegen seines flachen Bodens besteht bei der Evakuierung des Kolbens Implosionsgefahr. Standversuche mit mehreren Fernbachkolben erwiesen jedoch ihre Vakuumfestigkeit. Das erste Reaktionsgefäß mit einem Fernbachkolben als Grundkörper implodierte bei den Rotationsversuchen unter Vakuum. Wahrscheinlich addierten sich die Zug- und Torsionsspannungen im Glas, hervorgerufen durch Druck und Drehmoment, zu so hohen Werten, daß der Kolben implodierte.

Das nächste Reaktionsgefäß wurde aus einem 3l-Rundkolben hergestellt. Die Kugelform entspricht zwar nicht der Bedingung d, erfüllt aber die Bedingungen a) - c).

Den Übergang zum Antrieb des Kolbens bildet ein Flansch, der mittels einer Überwurfmutter an den Antrieb angeschlossen wird (Abb. 5).

Abb. 5: Reaktionskolben
1 Fritte, 2 Kolben, 3 Glasflausch zum Antrieb,
4 Öffnung für Probennahme



Auf das Gegenlager wird der Kolben mit einem Iso-Gewinde GL 32 geschraubt.
Damit bei der Filtration des Niederschlages das Filtrat nicht mit den dichtenden Teilen und den Kugellagern des Gegenlagers in Berührung kommt, wurde der Kolben durch ein Glasrohr verlängert, das durch das Gegenlager bis zur Absaugöffnung reicht.
Zur besseren Durchmischung der Reaktionslösung werden in den Kolben einige Teflonstücke gegeben.

1.2. Der Antrieb

Als Antrieb wurde ein Rotationsverdampfer Büchi Roatvapor-EL gewählt. Dieses Modell arbeitet mit einem gleichbleibenden Drehmoment im ganzen Regulierbereich. Dieser vollautomatische Ausgleich der Antreibsleistung ermöglicht eine reproduzierbare Geschwindigkeitseinstellung unter Leerlauf oder Last. Auf die Antriebswelle wird das Reaktionsgefäß direkt mit Flansch und Überwurfmutter angeschraubt.

Während des Dauerbetriebs zeigte sich, daß durch den hohen Drehwiderstand des Rotationsteils der Antriebsmotor so heiß wurde, daß die Fettfüllungen der Getriebekugellager in das Reaktionsgefäß ausliefen.
Der Rotationsverdampferantrieb mußte so umkonstruiert werden, daß die Wärme des Motors nicht auf den Getriebeteil übertragen wird.
Dieses Problem wurde durch Konstruktion eines Distanzkäfigs zwischen Motor- und Getriebeteil bei gleichzeitiger Wasserkühlung des Motors gelöst.

1.3. Das Gegenlager

Das ideale Gegenlager zum Antrieb soll so beschaffen sein, daß es:

a) druck- und vakuumdicht ist,

b) möglichst reibungsfrei läuft,

c) den Achsenversatz, der durch die Kolbenkonstruktion und ungenaues Einspannen bedingt ist, ausgleichen kann,

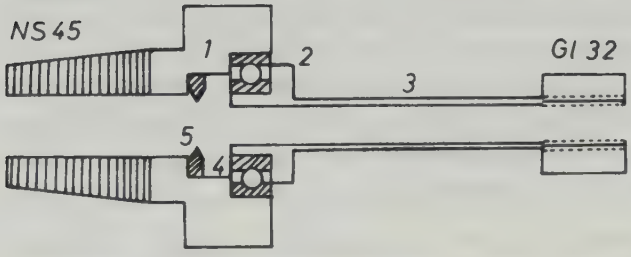
d) und durch die verwendeten Lösungsmitteldämpfe so wenig wie möglich angegriffen und korrodiert wird.

Bedingung d) beschränkt die zur Konstruktion des Lagers verwendeten Materialien auf Glas, Teflon und V4A-Stahl.

Zuerst wurde ein Lager folgender Konstruktion getestet.

In einem feststehenden Teflonschliffkern NS-45 ist der Stator eines Kugellagers 6006/2RS (gas- und wasserdicht) eingepreßt. In den Rotor ist das verdickte unter Ende eines dünnwandigen Teflonschlauches eingesetzt (Abb. 6).

Abb. 6: Teflongegenlager
1 Schliffkern mit Lagersitz, 2 Lagersitz des Rotors,
3 Teflonschlauch, 4 Kugellager, 5 Simmerring



Das obere Ende des Teflonschlauches wird durch eine GL32 Teflongewindemutter gebildet, auf welche das untere Ende des Reaktionsgefäßes geschraubt wird. Die Wandstärke des 70 mm langen Teflonschlauches (Ø 30 mm) muß so dünn sein, daß sie den Achsenversatz, der zwischen Antrieb und Gegenlager 5 - 10 mm beträgt, ausgleichen kann (d.h. die Lateralfederkraft muß unter der Bruchgrenze der Glaswand an der engsten Stelle des Reaktionskolbens liegen). Allerdings soll die Schlauchwandung wiederum so stark sein, daß der Schlauch das Drehmoment des Antriebs auf das Gegenlager überträgt, ohne sich zu verdrillen oder gar abzuscheren.
Ein günstiges Verhältnis zwischen Schlauchlänge und Lateralfederrate ergab empirisch folgenden Wert:

zu übertragendes Drehmoment ca. 1,5 kpm,

Laterralversatz 5 - 10 mm,

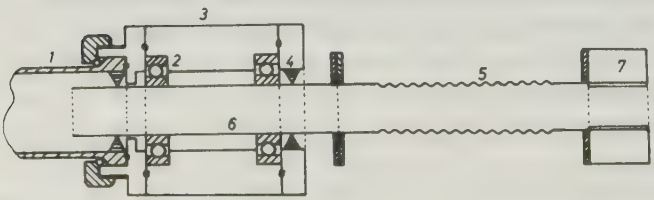
Verhältnis von Schlauchlänge zu Wanddicke 70 mm/0,5 mm.

Zwischen dem Kugellager und der unteren Öffnung des Gegenlagers wurde noch eine Gleitringdichtung angebracht, welche das Kugellager vor Filtrat und Lösungsmitteldämpfen schützen soll.
Auf den Teflonschliffkern wird ein kleiner Glaskolben gesteckt, der die Zuleitungen für Stickstoff und Lösungsmittel/Filtrat enthält.
Dieses Lager erfüllt alle Bedingungen. So wurden z.B. Unterdrücke von 20 Torr am Wasserstrahlvakuum erreicht.

Wegen der großen Kaltflußeigenschaften des Teflons wurde das Lager im Dauerbetrieb schnell undicht, sodaß eine bessere Lösung gefunden werden mußte.

Da das Teflon wegen der obengenannten Gründe als Lagermaterial ausscheidet, wurde als nächstes ein Lager aus V4A-Stahl konstruiert (Abb. 7).

Abb. 7: V4A Gegenlager
1 Glaskolben für Zuleitungen, 2 Kugellager,
3 Lagerhülse, 4 Simmerringe, 5 Faltenbalg,
6 Gasdurchführungsrohr, 7 Teflongewindemutter
GL 32



In den Rotor zweier Kugellager ist ein Gasdurchführungsrohr aus poliertem V4A-Stahl gesetzt. Auf die obere Seite des Stahlrohres ist ein Faltenbalg aus V4A-Stahl geflanscht, der den Achsenversatz des Reaktionskolbens ausgleichen soll.

Der Faltenbalg hat folgende Abmessungen:

Balg Ø	Anzahl Wellen	gew. Länge	Max.Drehmoment	Laterralfederrate 10 mm Versatz	Lastspiele
26 x 39,5	25	100	1,5 kp.m	0,8 kp/mm	300.000

Die Daten des Faltenbalges zeigen, daß er gut geeignet ist, das Drehmoment des Antriebs bei gleichzeitigem Ausgleich des Achsenversatzes zu übertragen.

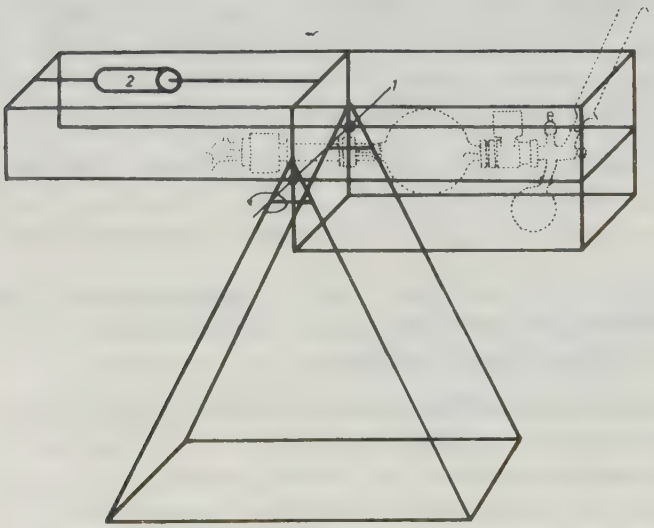
Den Übergang zwischen Faltenbalg und Reaktionsgefäß bildet eine durchbohrte Teflongewindemutter GL 32, die auf das Reaktionsgefäß geschraubt ist, und mit Hilfe eines Metallringes auf den Flansch des Faltenbalges gepreßt wird.
An das andere Ende des Lagers wird ein kleiner Kolben geschraubt, der die Zuleitungen für Stickstoff, Lösungsmittel und Reagentien enthält.
Das Gasdurchführungsrohr ist gegen Druck und Vakuum mit Vitonsimmerringen abgedichtet.
Mit diesem Gegenlager lassen sich im Gesamtsystem Unterdrücke am Wasserstrahlvakuum von 20 Torr im Dauerbetrieb aufrecht erhalten.

Allerdings hat das Gegenlager einen so hohen Drehwiderstand, daß die in Kap. III.1.2. beschriebenen Probleme auftraten.

1.4. Die Schwenkeinrichtung

Das gesamte System (Antrieb, Reaktionskolben, Gegenlager) ist in einem Metallkäfig aufgehängt (Abb. 8).

Abb. 8: Schwenkeinrichtung mit Reaktionskolben
1 Drehachse, 2 Bleigewicht



Der Käfig kann mit einem Motor über ein Schneckengetriebe um 90° aus der Horizontalen gedreht werden. Zur leichteren Drehbarkeit wird der Käfig durch ein verschiebbares Bleigewicht (15 kg) austariert.

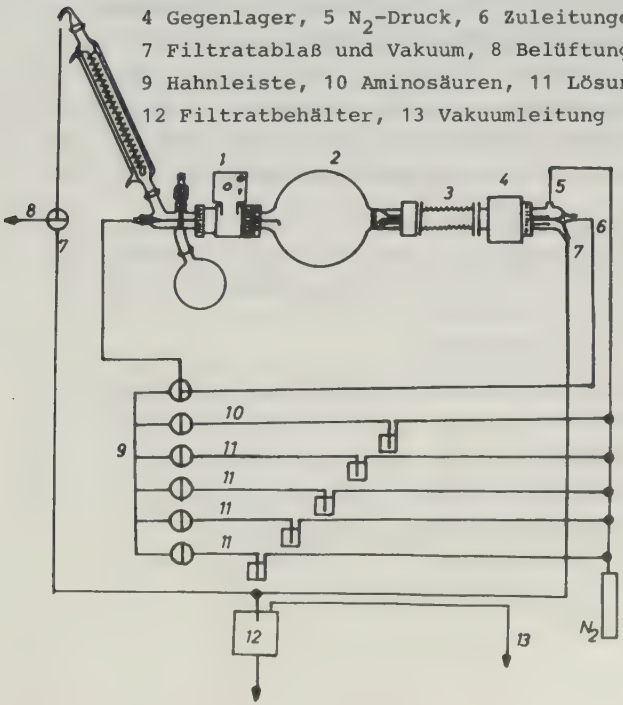
1.5. Heizung und Kühlung

Der Reaktionskolben wird je nach Bedarf durch ein offenes Bad, welches an einem Kältethermostat angeschlossen ist, geheizt oder gekühlt.
Damit der Kolben beim 90°-Schwenken nicht durch das Kühlbad behindert wird, muß er um mindestens den 1,5-fachen Kolbendurchmesser aus dem Drehmittelpunkt des Metallkäfigs versetzt sein.

1.6. Reagentien und Lösungsmittelzugabe

Ein Synthesezyklus läuft in der Apparatur nach folgendem Schema ab (Abb. 9).

Abb. 9: Fließbild der Syntheseapparatur
1 Antrieb, 2 Reaktionskolben, 3 Faltenbalg,
4 Gegenlager, 5 N_2-Druck, 6 Zuleitungen,
7 Filtratablaß und Vakuum, 8 Belüftung,
9 Hahnleiste, 10 Aminosäuren, 11 Lösungsmittel
12 Filtratbehälter, 13 Vakuumleitung



a) Das Reaktionsgefäß, in dem sich das trockene Polymerpeptid befindet, rotiert in waagerechter Lage in dem auf 20 - 25° C temperierten Heizbad.
In den Kolben werden zuerst durch die Fritte, dann durch das vordere Ende 250 ml Lösungsmittel gepreßt.

b) Nach 5 Minuten, wenn alles Polymerpeptid gelöst ist, wird durch den vorderen Zulauf der Boc-geschützte Aminosäureanhydrid und die entsprechende Menge N-Methylmorpholin als Base gegeben.

c) Nach Beendigung der Reaktion (die Reaktionszeit muß vorher ermittelt werden) wird durch Anlegen eines Vakuums an den Kühlerausgang die Lösung bis auf 100 ml eingeengt. Während der Destillation sind alle anderen Zu- oder Ableitungen geschlossen.

d) Unter gleichzeitiger Kühlung auf -5° C wird nach der Destillation ca. 1 l Äther zuerst durch die Fritte, dann durch das vordere Ende in das Reaktionsgefäß gepumpt.

e) Nach ca. 30 Minuten ist das gesamte Polymerpeptid ausgefallen. Die Synthesepparatur wird um 90° in die vertikale Lage geschwenkt, und durch Anlegen eines Vakuums an die Absaugleitung am unteren Ende wird das Polymerpeptid vom Lösungs- und Fällungsmittel abfiltriert.

f) Das System wird wieder in die Horizontale geschwenkt und der Niederschlag mit ca. 150 ml Äther gewaschen. Der Äther wird, wie in e) beschrieben, abfiltriert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt.

g) Der Niederschlag wird ca. 15 min im Vakuum getrocknet. Das Reaktionsgefäß rotiert dabei in waagrechter Lage im 20 - 25° C warmen Bad.

h) Der Niederschlag wird zweimal umgefällt, dabei werden alle Programmpunkte, außer b) wieder durchlaufen.

i) Vom so getrockenten Polymerpeptid wird die Schutzgruppe abgespalten. Dabei werden sämtliche Programmpunkte von a) - h), mit Ausnahme von b), wiederholt.
Bei Punkt a) wird an Stelle des Lösungsmittels das Abspaltungsreagens zugegeben.

j) Beginn eines neuen Synthesezyklus.

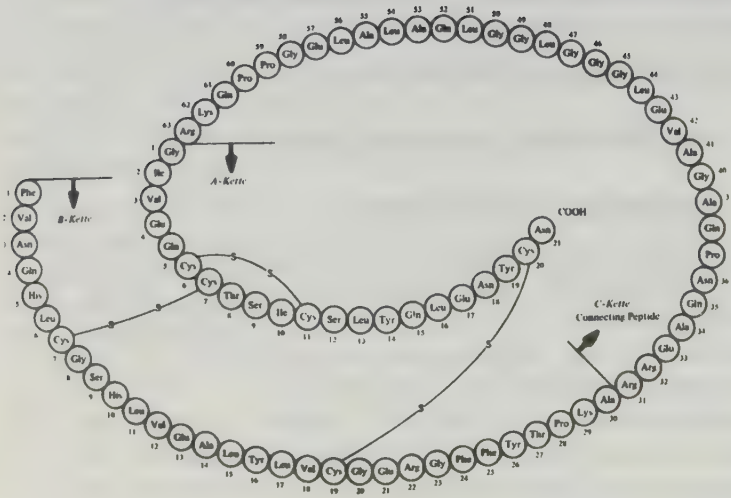
2. Peptidsynthesen in dem Synthesegerät

2.1. Synthese der Insulin-A-Kette

Insulin ist als anaboles Hormon an der Regulierung des Aufbaus von Glykogen, Fett und Protein beteiligt. Seine Konstitution wurde von F. Sanger (41,42,43) aufgeklärt. Es besteht aus zwei Peptidketten, der A-Kette mit 21 Aminosäuren und der B-Kette mit 30 Aminosäuren.
Die längere B-Kette liegt nach D.C. Hodkin in Form eines verzerrten U vor, in das sich die A-Kette anschmiegt (44). Die beiden Ketten sind durch zwei intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verknüpft, und die A-Kette weist noch eine intramolekulare Disulfidbrücke auf, sodaß ein bicyclisches System entsteht.

Die Biosynthese des Insulins erfolgt über eine einkettige höhermolekulare Vorstufe, das Proinsulin (Abb. 10).

Abb. 10: Proinsulin



In ihm sind die A- und B-Kette mit einer C-Kette so miteinander geknüpft, daß die entstehende räumliche Anordnung der Cystinmoleküle eine selektive Knüpfung der Disulfidbrücken ermöglicht (45,46,47,48).

Mit Ausnahme der Insulinsynthese von P. Sieber (49) mit gezielter Bildung der Disulfidbrücken bestand das strategische Konzept aller anderen Insulinsynthesen auf dem getrennten Aufbau der beiden Peptideketten. Anschliessend werden die Ketten durch statistische Oxydation zum biologisch-aktiven Produkt rekombiniert.

Dabei wurden die verschiedenen Synthesestrategien angewandt:

Klassische Fragmentkondensation (50,51,52,53)
Aufbau am festen Träger (54,55)
Fragmentkondensation am festen Träger (56).

In den folgenden Kapiteln wird der stufenweise Aufbau der Insulin-A-Kette am Polyäthylenglykol MG 20 000 und die gemeinsame Reduktion der Tetra-S-Benzyl-A-Kette mit dem natürlichen B-Ketten-bis-thiosulfat (57) beschrieben.

2.1.1. Wahl der Schutzgruppen und Kupplungsmethoden

Da keine, unter den Synthesebedingungen stabile Amidschutzgruppe zur Verfügung stand und sich außerdem Asparagin nur in geringer Ausbeute mit Polyäthylenglykol verestern läßt, wurde die von Weber et.al. (58) beschriebene $Ala^{18,21}$-A-Kette synthetisiert.

Alanin wurde mit Polyäthylenglykol MG 20 000 als lösliche polymere, C-terminale Schutzgruppe verestert.

Zum Schutz der Aminofunktion wurde für alle Aminosäuren die t-Butyloxycarbonylgruppe verwandt.

Die Schwefelfunktion des Cysteins wird mit der Benzylgruppe geschützt.

Tyrosin, Serin und die Glutaminsäure werden als Benzyläther bzw. Benzylester eingesetzt.

Die zu kuppelnden Aminosäuren werden mit Dicyclohexylcarbodiimid in die symmetrischen Anyhdride überführt. Diese Reaktion wird wegen der in anderen Lösungsmitteln erhöhten Racemisierungsgefahr in Methylenchlorid durchgeführt (59). Die Kupplung erfolgt je nach Löslichkeit des Polymerpeptids in Methylenchlorid, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxyd oder Gemischen aus diesen Lösungsmitteln.

Die Abspaltung der Aminoschutzgruppe erfolgt in 1,2 n HCl/ Eisessig oder 100%-iger Trifluoressigsäure.

Die Kupplungsausbeute wird mit Hilfe eines qualitativen Fluramtests ermittelt.
Die genauen Details werden im Experimentellen Teil Kap. V.9. beschrieben.

2.1.2. Synthese der Insulin-A-Sequenz 21 - 15 in dem Synthesegerät nach dem Rotationskolbenprinzip

Die Sequenz der Insulin-A-Kette $Ala^{21,18}$-Gln^{15} wurde in dem beschriebenen Synthesegerät dargestellt.
Ein Reaktionszyklus lief nach dem in Kap. III 1.6. beschriebenen Schema ab.
Die Löslichkeit des Polymerpeptids in Methylenchlorid nahm ab dem Tetrapeptid Ala^{18} merklich ab. Dieses zeigte sich an schwach gelben Schlieren von im Lösungsmittel gequollenen Polymerpeptid, das noch einige Zeit, nach Zugabe des Lösungsmittels, an der sich drehenden Kolbenwand herunterlief.
Bei der Stufe Glu^{17} und den darauffolgenden Zyklen wurden Lösungsmittelgemische aus Methylenchlorid und Dimethylformamid eingesetzt.
Beim Reaktionszyklus des Heptapeptids sank die Vakuumdichtigkeit des Synthesegerätes soweit herab, daß eine Vakuumtrocknung und -destillation nicht mehr möglich war.
Die Synthese wurde bei dieser Stufe abgebrochen und das Polymerpeptid aus dem Reaktionskolben entnommen.

Eine Untersuchung des Teflongegenlagers und des Antriebs zeigte, daß der Lagersitz im Gegenlager stark aufgeweitet und die Kugellager im Antrieb und Gegenlager erheblich korrodiert waren.
Die Gründe für diesen Defekt sind in Kap. III.1.2. und III.1.3. ausführlich beschrieben.

Da eine Umkonstruktion des Gegenlagers und des Antriebs zuviel Zeit in Anspruch nahm, wurde die Synthese manuell weitergeführt.

Die Aminosäureanalyse des Heptapeptids ergab folgende Werte:

Hydrolyse: 24 h, 6n HCl, 110° C

	Glu	Ala	Leu	Tyr^{+}	Cys(SBzl)$^{+,++}$
theor.	2	2	1	1	1
gef.	1,82	2	1,04	0,47	0,46

Bezogen auf Ala = 2

$^{+}$ teilweise Zerstörung

$^{++}$ teilweise Hydrolyse zum Cystein

2.1.3. Manuelle Weiterführung der Synthese

Aus den vorhergenannten Gründen wurde die Synthese der Insulin-A-Kette manuell weitergeführt.

Die Aminoschutzgruppe wurde jetzt mit 1,2n HCl/Eisessig abgespalten, um einerseits Nebenreaktionen des Tyrosinbenzyläthers (60) zu umgehen und andererseits die teure Trifluoressigsäure zu sparen.
Das Undekapeptid wurde jedoch in 1,2n HCl/Eisessig unlöslich, sodaß bei den folgenden Reaktionszyklen wieder Trifluoressigsäure verwandt werden mußte.

Auch das Polymerpeptid wurde mit steigender Kettenlänge in dem Methylenchlorid/Dimethylformamid-Gemisch immer schwerer löslich. Beim Decapeptid wurde reines Dimethylformamid als Lösungsmittel eingesetzt. Die Löslichkeit des Polymerpeptids nahm auch weiterhin stark ab, sodaß die letzten drei Reaktionszyklen in reinem Dimethylsulfoxid durchgeführt wurden.

Beim Dodekapeptid und allen weiteren Stufen trat während der Kupplung ein neuer Effekt auf.
Nach Zugabe der aktivierten Komponente und Neutralisation kam es plötzlich zu erheblichen Viskositätserhöhungen der Reaktionslösung, die im Laufe der Zeit wieder zurückging.
Beim Tetradecapeptid ist die Viskositätserhöhung der Lösung so groß, daß sie "gelatinös" erstarrt. Dieses Gel konnte erst nach Zugabe von 500 ml Dimethylformamid gelöst werden. Bei den folgenden Reaktionszyklen wurde sofort bei Beginn der Viskositätszunahme weiteres Lösungsmittel zugesetzt, um das Erstarren der Lösung zu verhindern.
Über den Grund der Viskositätszunahme können bis jetzt nur Spekulationen angestellt werden.

Die Kupplungen erfolgten laut Fluramtest und Aminosäureanalyse in guten Ausbeuten. Die Proben zum Fluramtest wurden der Reaktionslösung direkt nach Zugabe des Aminosäureanhydrids und gleichzeitiger Neutralisation entnommen.
Der Test verlief in allen Fällen negativ und weist auf eine sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeit zwischen dem Aminosäureanhydrid und dem Polymerpeptid hin.

Laut Aminosäureanalyse ergaben sich für das Heneicosapeptid folgende Werte:

Hydrolyse: 24 h, 6n HCl, 110° C

	Ser^{+}	Glu	Gly	Ala	Val^{++}	Ile^{++}	Leu	Tyr^{+}	Cys(SBzl)$^{+++}$
theor.	2	4	1	3	2	1	2	2	4
gef.	1,55	3,66	0,85	3	1,01	0,33	1,94	0,58	3,67

Bezogen auf Ala = 3

$^{+}$ teilweise Zersetzung
$^{++}$ Hydrolyseresistenz Val-Ile
$^{+++}$ Hydrolyse zum Cys

Da Glycin, als letzte Aminosäure, nur einmal in der Insulin-A-Kette vorkommt, kann der Glycingehalt als Anhaltspunkt für das Gelingen der Synthese herangezogen werden.

2.1.4. Aufarbeitung und Charakterisierung der Insulin-A-Kette

Die Insulin-A-Kette sollte nach folgendem Schema aufgearbeitet und gereinigt werden:

1) Alkalische Hydrolyse des Polymerpeptids und anschliessende Trennung des Peptids vom Polyäthylenglykol.
2) Saure Spaltung der Benzylester, bzw. -äther mit Trifluoressigsäure/Bromwasserstoff und Zwischenreinigung des Peptids mittels Gelfiltration.
3) Darstellung der Tetrathiosulfat-A-Kette durch Behandlung der Tetra-S-Benzyl-A-Kette mit Natrium in flüssigem Ammoniak und nachfolgender Sulfitolyse.
4) Die durch Ionenaustauschchromatographie gereinigte Tetrathiosulfat-A-Kette wird mit natürlicher Dithiosulfat-B-Kette rekombiniert.
5) Anschließende biologische, chemische und physikalische Untersuchung des entstandenen Hybridinsulins.

Die alkalische Hydrolyse des Polymerpeptids verlief jedoch in so schlechten Ausbeuten, daß die Tetrathiosulfat-A-Kette nicht mehr dargestellt werden konnte.
Die Tetra-S-Benzyl-A-Kette wurde nach H. Zahn (57) mit einer äquimolaren Menge Dithiosulfat-B-Kette mit Natrium in flüssigem Ammoniak behandelt, dialysiert und autoxydiert.
Die Vergleiche der UV- und IR-Spektren des Hybridinsulins mit natürlichem Rinderinsulin zeigen eine gute Übereinstimmung. Auch die Niederspannungselektrophorese weist auf das Vorhandensein von Insulin hin.

Im Fettzellentest nach M. Rodbell (61) und A.J. Moody (62) zeigte das synthetische Insulin keine biologische Aktivität.

2.2. Synthese eines Pentapeptids der Sequenz His-Phe-Phe-Val-Gly in dem Synthesegerät

2.2.1. Syntheseplan und Schutzgruppenwahl

Polyäthylenglykol MG 3000 diente als lösliche polymere Carboxylschutzgruppe.
Zum Schutz der Aminofunktion wurde die t-Butyloxycarbonylgruppe gewählt.
Die sekundäre Aminofunktion im Imidazolring des Histidins wurde ebenfalls mit der t-Butyloxycarbonylgruppe geschützt.
Die Kupplungen werden mit den symmetrischen Anhydriden der Aminosäuren in Dichlormethan durchgeführt. Die Darstellung aller Anhydride erfolgt mit Dicyclohexylcarbodiimid in Methylenchlorid.
Die Kupplungsausbeute wurde mit Hilfe des Fluramtests ermittelt.
Die Abspaltung der Aminoschutzgruppe erfolgte in 100%-iger Trifluoressigsäure.

2.2.2. Durchführung der Synthese und Beobachtungen zum Syntheseverlauf

Die Synthese wurde in dem Synthesegerät nach dem Rotationskolbenprinzip durchgeführt. Ein Reaktionszyklus lief nach dem in Kapitel III.1.6. beschriebenen Schema ab.

Beim Ausfällen des Peptidesters aus Methylenchlorid mit Diäthyläther traten erhebliche Schwierigkeiten auf. Bei Fällungsversuchen aus reinem Methylenchlorid fiel der Peptidester nicht kristallin aus, sondern schied sich als

gelbliches Öl ab. Dieses Öl erstarrte zwar während der Kühlung, wurde aber bei Temperatursteigerung während der Filtrationsphase wieder flüssig.

Während der ersten zwei Reaktionszyklen konnte diese Schwierigkeit durch Fällungen mit einem Diäthyläther/ Äthanolgemisch 1:1 umgangen werden.
Bei den letzten drei Stufen versagte die Fällungsmethode.

Während dieser Reaktionszyklen wurden die Niederschläge in Äthanol gelöst und mit Äther gefällt.
Die Kupplungen wurden in Methylenchlorid durchgeführt. Nach jeder Kupplung wurde das Methylenchlorid am Vakuum abdestilliert und der Rückstand in Äthanol aufgenommen und anschließend mit Äther gefällt.
Die Kupplung der letzten Aminosäure, des Histidins, verlief laut Fluramtest nicht quantitativ . Es wurde eine Nachkupplung notwendig.
Die Gesamtausbeute an Polymerpeptid betrug, bezogen auf den eingesetzten PEG-Glycinester, 65%. Diese Verluste lassen sich mit den schon erwähnten Fällungschwierigkeiten erklären.

Die Aminosäureanalyse des Polymerpentapeptidesters ergab folgende Werte:

Hydrolyse: 6n HCl, 110° C, 24 h

	Gly	Val	Phe	His
theor.	1	1	2	1
gef.	1	0,93	1,97	1,05

Bezogen auf Gly = 1

2.2.3. Abspaltung und Charakterisierung des Peptids

Der Peptidester wurde in 2n Kalilauge hydrolysiert. Durch Ausschütteln der neutralisierten wässrigen Lösung mit Chloroform konnte der größte Teil des Polyäthylenglykols vom Peptid getrennt werden.
Das Lyophilisat der wässrigen Phase wurde in Methanol gelöst und an Sephadex LH 20 getrennt. Nach einmaliger Trennung konnte das Pentapeptid dünnschichtchromatographisch rein dargestellt werden.

Die Analysenwerte des Pentapeptids zeigten eine gute Übereinstimmung mit den theoretischen Daten:

Hydrolyse: 6n HCl, 110° C, 24 h

	Gly	Val	Phe	His
theor.	1	1	2	1
gef.	1	1,04	1,97	1,02

Bezogen auf Gly = 1

3. Synthesegerät nach dem alternierenden Druckprinzip

3.1. Prinzipielle Überlegungen

Um die schon erwähnten Schwierigkeiten bei Konstruktion und Betrieb des Synthesegerätes nach dem Rotationskolbenprinzip zumindestens teilweise umgehen zu können, wurde versucht, ein neues Synthesegerät zu entwickeln, welches auf völlig anderen mechanischen Prinzipien beruht.
Die Konstruktion und Entwicklung dieses neuen Synthesegerätes basiert auf folgenden Überlegungen.
Die Durchlässigkeit einer horizontalen Filterplatte über der eine Flüssigkeit steht, ist für diese Flüssigkeit von mehreren Parametern abhängig.

1) vom Porendurchmesser der Filterplatte,

2) von der Druckdifferenz $p_o - p_u = p$ des Drucks unter der Filterplatte p_u und des Drucks über der Flüssigkeit p_o,

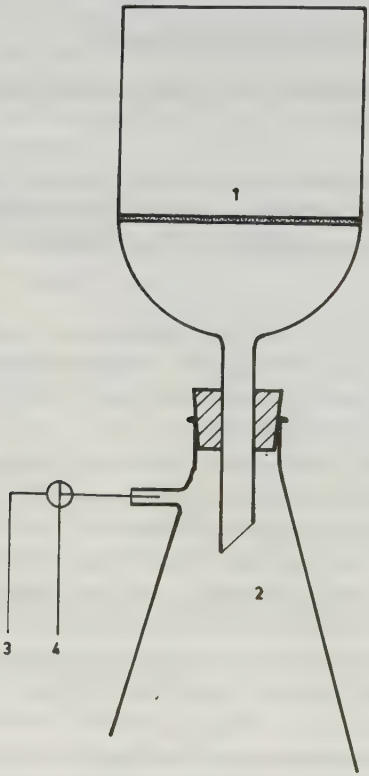
3) von der Viskosität der Flüssigkeit,

4) vom hydrostatischen Druck der Flüssigkeit auf die Filterplatte,

5) ist die Flüssigkeit eine Aufschlämmung kristalliner oder amorpher Teilchen, ist die Durchlässigkeit ferner vom Teilchendurchmesser und der Höhe des Filterkuchens abhängig.

Für den Fall $p_u \geq p_o$ wird mit steigendem p ein Punkt erreicht, an dem die Flüssigkeit die Filterplatte nicht mehr passieren kann, sondern das Gas unter der Filterplatte durch die Flüssigkeit perlt.
Auf Grund dieser Überlegungen mußte es möglich sein, ein Gefäß zu konstruieren, dessen Boden aus einer Fritte besteht und in dem chemische Reaktionen in flüssiger Phase ablaufen, ohne daß die Reaktionslösung durch die Fritte läuft. Für die Peptidsynthese nach der Liquid-Phase-Methode ist es nur wichtig, ein geeignetes p zu finden. Alle anderen Bedingungen stehen von vorneherein fest oder ändern sich während eines Reaktionszyklus nur unwesentlich.
Erste Vorversuche wurden mit folgender Versuchanordnung durchgeführt (Abb. 11).

Abb. 11: Versuchsanordnung
1 Fritte, 2 Gefäß für Filtrat ,
3 Vakuum, 4 Preßluft



Eine Glasfilternutsche G3 Ø 15 cm wird druckfest mit einer 0,5 l Saugflasche verbunden. An den Vakuumstutzen der Saugflasche wird eine Druckleitung gelegt.

Während der Versuche zeigte sich, daß nur ein geringer Überdruck (ca. 50 mm Hg) benögte, um ein Durchlaufen des über der Fritte stehenden Lösungsmittels (Methylenchlorid, Diäthyläther, Äthanol, zu verhindern. Dieser Druck ist so gering, daß auch das Druckgas die Fritte nicht in Gegenrichtung passieren kann.
Ein Filterkuchen von frischgefälltem Polyäthylenglykol konnte nach Anlegen des Überdrucks unter die Fritte in Methylenchlorid gelöst werden, ohne daß die Lösung die Fritte passierte. Aus dieser Lösung wurde das Polyäthylenglykol mit Diäthyläther gefällt und anschließend durch Druckänderung unter der Fritte (Überdruck/Unterdruck) abfiltriert. Dieser Vorgang ließ sich beliebig oft wiederholen.

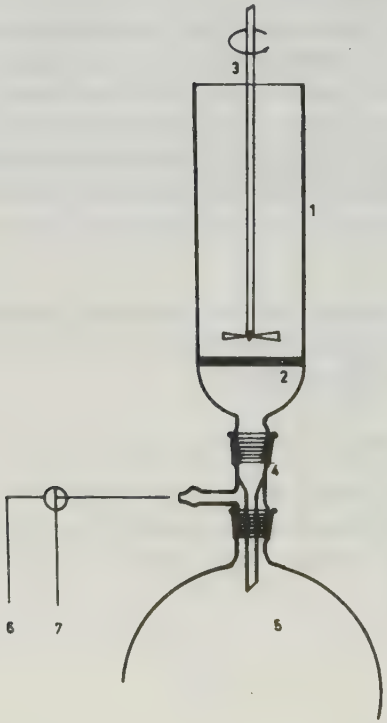
Diese Vorversuche beweisen, daß es prinzipell möglich ist, in dieser Versuchanordnung Oligopeptide nach der Liquid-Phase-Methode zu synthetisieren.

3.2. 1. Prototyp und Vorversuche

Nach den Ergebnissen dieser Vorversuche wurde ein Prototyp konstruiert, in welchem erste Versuche zur Peptidsynthese stattfinden sollten (Abb. 12).

Abb. 12: 1. Prototyp Fließbild

1 Reaktionsgefäß, 2 Fritte, 3 Rührer,
4 Vorstoß, 5 Filtratkolben, 6 N_2 Druck,
7 Vakuum



Das Rekationsgefäß ist ein oben offenes und sich unten verjüngendes Glasrohr. Zu Beginn der Verjüngung ist eine Glasfritte G3 eingeschmolzen. Am Ende der Verjüngung ist ein Normenschliffkern NS 29 angeschmolzen. Dieser Schliffkern ist über einen Vakuumvorstoß "gerade" mit einem 1 l-Kolben verbunden.
An den Saugstutzen des Vakuumvorstoßes kann über einen Dreiweghahn wechselweise ein Stickstoffüberdruck oder ein Vakuum angelegt werden.
Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wird mit einem Rührer durchmischt.
Das Gefäß ist eng mit einem PVC-Schlauch umwickelt, in dem eine Kühlflüssigkeit zirkuliert.

In diesem Gefäß wurden mehrere Reaktionszyklen der Peptidsynthese mit reinem Polyäthylenglykol simuliert.

In den Reaktor werden ca. 10 g Polyäthylenglykol MG 6 000 gegeben und nach Anlegen eines Stickstoffüberdrucks von ca. 100 mm Hg unter die Fritte in 100 ml Methylenchlorid gelöst.

Ist alles Polyäthylenglykol gelöst, wird unter Kühlung so lange Äther zugegeben bis sämtliches Polymer ausgefallen ist.

Anschließend wird unter die Fritte ein Wasserstrahlvakuum gelegt und der Niederschlag abfiltriert.

Danach wurde der Niederschlag wieder gelöst und der Fällungsvorgang wiederholt.

In dem eingeengten Filtrat ließ sich in keinem Fall Polyäthylengylkol durch Umfällen nachweisen.
Es wurden verschiedene Lösungsmittel, wie Methylenchlorid, Äthanol, Dimethylformamid, Tetrahydrofuran und Essigsäure getestet.

3.2.1. Synthese eines Tetrapeptids der Sequenz PEG_6Ala-Gly-Leu-Ala in dem Reaktionsgefäß

Nach den erfolgreichen Vorversuchen sollten nun die ersten Synthesen durchgeführt werden.

Als C-terminale polymere Schutzgruppe diente Polyäthylenglykol MG 6 000.
Alle Aminosäuren wurden mit der t-Butyloxycarbonylgruppe geschützt.
Die Kupplung erfolgt mit den symmetrischen Anhydriden der Aminosäuren in Methylenchlorid. Die Anhydride wurden mit Dicyclohexylharnstoff als Agens in Methylenchlorid separat dargestellt.
Der Umsatz wird mit Hilfe des Fluramtests ermittelt.
Die Aminoschutzgruppe wurde in 1,2n HCl/Eisessig abgespalten.

Ein Synthesezyklus lief in dem Gefäß wie folgt ab:

Unter die Fritte wird ein Überdruck von ca. 200 mm Quecksilbersäule gegeben. Das Polymerpeptid wird unter Rühren in soviel Methylenchlorid gelöst, daß eine ca. 10%-ige Lösung entsteht. Zu dieser Lösung gibt man das Aminosäureanhydrid und eine äquivalente Menge an N-Methylmorpholin.

Nach Ablauf der Reaktionszeit wird unter Kühlung soviel Äther in das Gefäß gegeben, bis das Polymerpeptid ausgefallen ist. Bei beendeter Fällung wird unter die Fritte ein Vakuum gelegt und der Niederschlag abfiltriert. Das Vakuum läßt man einige Zeit bestehen, um den Niederschlag trockenzusaugen.
Der Niederschlag wird nach obiger Vorschrift durch zweimaliges Umfällen von den niedermolekularen Überschüssen befreit.
Bei Abspaltung der t-Butyloxycarbonylgruppe mit 1,2n HCl/Eisessig ist der Stickstoffdruck unter der Fritte so

gering zu halten, daß kein Stickstoff durch die Fritte perlt. Der durchströmende Stickstoff kann Chlorwasserstoff aus dem Eisessig vertreiben und damit eine unvollständige Abspaltung bewirken. Die Ätherfällung des deblockierten Polymerpeptids erfolgt wie schon beschrieben.

Der Niederschlag wird zur restlosen Entfernung des Eisessigs zweimal aus Methylenchlorid/Äther umgefällt.

3.2.2. Durchführung der Synthese und Beobachtungen zum Syntheseverlauf

Zur Synthese wurden 6 g Bis-Boc-Alanyl-Polyäthylenglykol in dem Reaktionsgefäß in 60 ml Methylenchlorid gelöst. Ein Reaktionszyklus lief nach dem im vorigen Kapitel beschriebenen Schema ab. Die Reaktionsdauer betrug 3 h. Nach 1 h wurde eine Probe zum Fluramtest entnommen.

Im Laufe der Synthese wurden die Filtrationszeiten für den Niederschlag immer länger. Dieser Vorgang kann nur mit einem allmählichen Verstopfen der Fritte erklärt werden. Wahrscheinlich diffundiert doch ein kleiner Teil der Polymerpeptidlösung in die Fritte, und fällt dort beim Abziehen des Äthers aus. Die Diffusion wird am größten bei der Boc-Abspaltung mit 1,2n HCl/Eisessig sein, wenn der Druckunterschied zwischen Ober- und Unterseite der Fritte besonders gering ist.

Zur Vermeidung dieses Fehlers wurde ein neues Synthesegefäß konstruiert.

Die Aminosäureanalyse des Polymerpeptids ergab folgende Werte:

Hydrolyse 6n HCl, 110° C, 24 h

	Gly	Ala	Leu
theor.	1	2	1
gef.	0,97	2	0,95

Bezogen auf Ala = 2

3.2.3. Abspaltung und Charakterisierung des Peptids

Der PEG-Peptidester wurde in 2n Kalilauge hydrolysiert, und das Hydrolysat mit 1n HCl neutralisiert. Die neutrale Lösung wird zur Entfernung des Polyäthylenglykols mit Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird lyophilisiert und anschließend an Sepahdex LH 20 chromatographiert. Das erhaltene Produkt war dünnschichtchromatographisch rein, und ergab folgende Aminosäureanalyse:

Hydrolyse: 6n HCl, 110° C, 24 h

	Gly	Ala	Leu
theor.	1	2	1
gef.	0,98	2	1,05

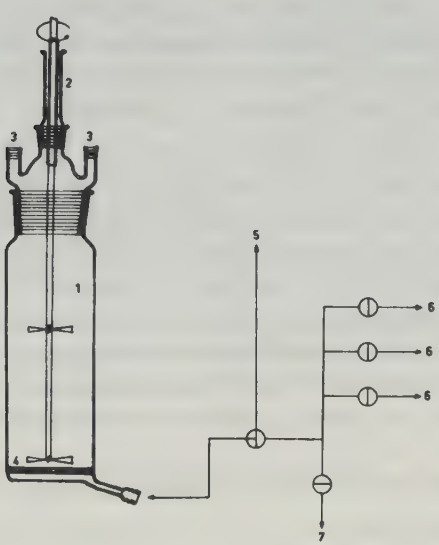
Bezogen auf Ala = 2.

3.3. 2. Prototyp und Vorversuche

Um die bei der Synthese des Tetrapeptids aufgetretenen Mängel des Synthesegerätes zu beheben, wurde ein neuer Prototyp konstruiert. Bei diesem Reaktionsgefäß muß die Fritte während der Synthese gereinigt werden können. Dieses läßt sich nur bewerkstelligen, wenn ein Teil des benötigten Lösungsmittels von unten durch die Fritte in das Reaktionsgefäß gepumpt wird (Abb. 13).

Abb. 13: 2. Prototyp

1 Reaktionsgefäß, 2 Rührer,
3 Belüftung und Reagentienzugabe,
4 Fritte, 5 Stickstoffleitung,
6 Lösungsmittel, 7 Vakuum und Filtrat



Das Reaktionsgefäß ist ein Glaszylinder NS 45 mit einem seitlichen Anschluß am Boden. Über dem Boden ist eine Glasfritte G 3 eingeschmolzen. Der Abstand zwischen Boden und Fritte muß so klein als möglich sein, um das Totvolumen zu vermindern. Durch den seitlichen Anschlußstutzen kann unter die Fritte Stickstoff-Überdruck, bzw. Vakuum gelegt werden. Auch kann durch diesen Anschluß Lösungs- bzw. Fällungsmittel in das Gefäß gepumpt werden.

Die Steuerung erfolgt über eine Hahnleiste und Dreiweghähne. Die Lösungsmittel werden mit Stickstoff aus den Vorratsgefäßen in das Reaktionsgefäß gedrückt (Abb. 13). Der Reaktionszylinder wird oben mit einem "Dreihalsdeckel" verschlossen. Der mittlere Hals, NS 29, dient zur Aufnahme eines KPG-Rührers. Die beiden seitlichen Hälse, NS 14,5, werden zur Be- und Entlüftung und zur Zugabe von Lösungsmitteln und Reagentien verwandt. Der Zylinder ist eng mit einem PVC-Schlauch umwickelt, in dem eine Kühl-, bzw. Heizflüssigkeit zirkuliert.

Fällungsversuche mit reinem PEG verliefen zufriedenstellend. Bei diesen Versuchen wurde das Lösungs- und Fällungsmittel von unten durch die Fritte in das Reaktionsgefäß gedrückt. Dadurch konnte das Verstopfen der Fritte verhindert werden. Ein Synthesezyklus läuft nach dem in Kapitel III.3.2.1. beschriebenen Schema ab. Der einzige Unterschied besteht darin, daß die Lösungs- und Fällungsmittel durch die Fritte gedrückt werden. Die aktivierte Aminosäure und das N-Methylmorpholin werden weiterhin von oben in den Reaktor gegeben.

3.3.1. Synthese der Insulin-A-Kettensequenz Ala^{21}-Glu^{21}

Es sollte versucht werden, die Insulin-A-Kette in dem Reaktionsgefäß zu synthetisieren. Dabei sollte die Leistungsfähigkeit des Gerätes bewiesen und die Grenze ermittelt werden, bis zu welcher Kettenlänge Peptide in diesem Apparatetyp darstellbar sind.

Als Aminoschutzfunktion wurden bei allen Aminosäuren die t-Butyloxy-carbonylgruppe eingesetzt.
Die Hydroxyl- und -Carboxylfunktion im Tyrosin und der Glutaminsäure wurden mit der Benzylgruppe geschützt.
Cystein wurde als Isopropyldisulfid eingesetzt.
Die Amidgruppen im Asparagin und Glutamin blieben ungeschützt.

Alanin wurde mit Polyäthylenglykol als Carboxylschutzgruppe verestert.
Die Kupplung erfolgte mit den symmetrischen Anhydriden der Aminosäuren in Methylenchlorid. Die Anhydride wurden mit Dicyclohexylcarbodiimid im Methylenchlord separat dargestellt.
Asparagin wurde in einem Gemisch von Dimethylformamid/Tetrahydrofuran mit 1-Hydroxy-benzotriazol und Dicyclohexylcarbodiimid voraktiviert.
Die Abspaltung der Boc-Gruppe erfolgt im Gegensatz zur vorigen Synthese in 100%-iger Trifluoressigsäure. Diese Abspaltungsmethode wurde gewählt, weil die Trifluoressigsäure einen höheren Stickstoffdruck unter der Fritte zuläßt und damit die erhöhte Verstopfungsgefahr der Fritte bei der Abspaltung mit Chlorwasserstoff/Eisessig beseitigt.

Der Umsatz wurde mit dem Fluramtest ermittelt. Dieser Test verlief bei allen Kupplungen nach einer Stunde negativ. Trotzdem ergab die Aminosäureanalyse des Hexa- und Nonapeptids nicht produzierbare Werte.

Hexapeptid: Hydrolyse 6n HCl, 110° C, 24 h

	Glu	Asp	Ala	Cys	Leu	Tyr
theor.	1	1	1	1	1	1
gef.	0,21	0,91	1	0,56	0,15	0,63

Bezogen auf Ala = 1

Nonapeptid: Hydrolyse 6n HCl, 110° C, 24 h

	Glu	Asp	Ala	Cys	Leu	Tyr
theor.	2	1	1	1	2	2
gef.	0,15	1,08	1	-	0,35	0,76

Bezogen auf Ala = 1

Auf Grund dieser Werte wurde die Synthese abgebrochen, und das Hexa- und Nonapolymerpeptid einer Probeabspaltung unterworfen.

3.3.2. Abspaltung und Charakterisierung des Peptids

Zur Deutung der schlechten Analysenwerte bei der Synthese des Hexa- und Nonapolymerpeptidesters wurden diese in 1n Natronlauge hydrolysiert. Die neutralisierte Lösung wurde mit Methylenchlorid ausgeschüttelt, lyophilisiert und anschließend an Sephadex G 25 getrennt. Die Chromatogramme zeigten ein nicht identifizierbares Produktengemisch.
Das Dünnschichtchromatogramm der Lyophylisate des Hexapeptids zeigte 6, das des Nonapeptids 9 Flecken.

Einige Fraktionen der Trennung des Nonapeptids wurde auf ihren Fluorgehalt untersucht. Der Fluorgehalt der einzelnen Fraktionen lag zwischen 7 und 10 %.

Dieses Ergebnis führt zu dem Schluß, daß das Abspaltungsagens Trifluoressigsäure nicht durch dreimaliges Fällen des Polymerpeptids entfernt werden kann. Die restliche Trifluoressigsäure reagiert bei der Kupplung entweder mit überschüssigem Dicyclohexylcarbodiimid oder mit dem Aminosäureanhydrid zu den gemischten Anhydriden und blockiert irreversibel Teile der Peptidkette. Es ist also unbedingt notwendig, durch eine Vakuumtrocknung nach der letzten Fällung, die noch verbliebenen Spuren an Trifluoressigsäure zu entfernen.

Eine Vakuumtrocknung kann aber in diesem Reaktionsgefäß nicht durchgeführt werden. Der Reaktor hat einen flachen Boden, und damit besteht bei der Evakuierung eine erhebliche Implosionsgefahr.

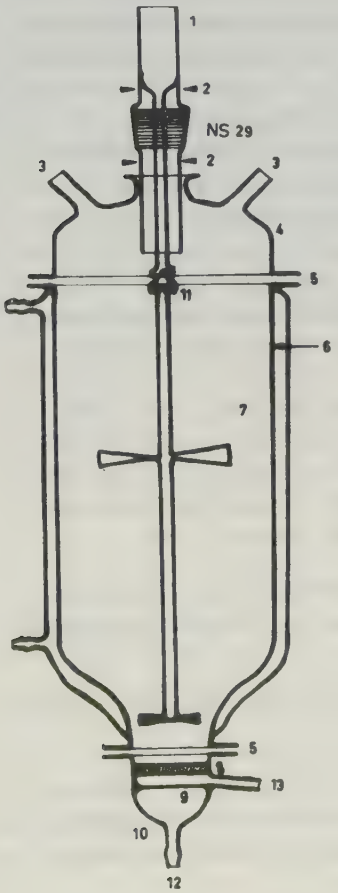
Das Gefäß muß so umkonstruiert werden, daß in ihm eine Vakuumtrocknung des Polymerpeptids möglich ist.

3.4. Der 3. Prototyp

3.4.1. Beschreibung des Reaktionsgefäßes

Das Reaktionsgefäß besteht aus einem doppelwandigen Glaszylinder mit Planschliffen an beiden Enden (Abb. 14).

Abb. 14: 3. Prototyp



1 Rührer
2 Simmerringe
3 Belüftung und Probennahme
4 Deckel
5 Planschliff
6 Kühlmantel
7 Reaktionszylinder
8 Fritte
9 1. Boden
10 2. Boden
11 Spritzdüsen
12 Vakuumstutzen
13 Lösungsmittelzugabe

Auf den Planschliff des sich verjüngenden unteren Endes des Zylinders wird der Bodenteil des Gefäßes gesteckt. Der Bodenteil ist ein kurzer birnenförmiger Planschliffkolben mit doppeltem Boden. In den Planschliff ist eine Glasfritte G 3 eingeschmolzen. Dicht unter der Glasfritte befindet sich der erste Boden. In den Raum zwischen Fritte und Boden kann über einen Stutzen Inertgas oder Lösungsmittel geleitet werden.
Zwischen dem ersten und zweiten Boden herrscht immer der gleiche Durck wie im Reaktionsgefäß. Dadurch ist eine Implosion des Gefäßes während der Evakuierung ausgeschlossen.
Der gewölbte Deckel des Gefäßes hat drei Öffnungen. Die beiden seitlichen Öffnungen, zwei NS 14,5 Schliffkerne, dienen der Be- und Entlüftung und der Probennahme.
Auf die mittlere Öffnung, ein Glasflansch, wird ein Rotationsverdampfermotor geschraubt.
Während der Peptidsynthesen mit den schon beschriebenen Prototypen blieb bei jedem Fällungsvorgang ein geringer Teil des Niederschlages an der Gefäßwand und am Rührer haften. Diese Rückstände müssen unbedingt von der Gefäßwand gelöst werden, um die Bildung von Fehl- oder Rumpfsequenzen zu vermeiden. Bei den vorhergehenden Synthesen wurden diese Rückstände mit einer Spritzflasche abgelöst. Der Vorgang sollte in diesem Gefäß automatisch erfolgen. Für dieses Problem boten sich zwei Lösungen an:

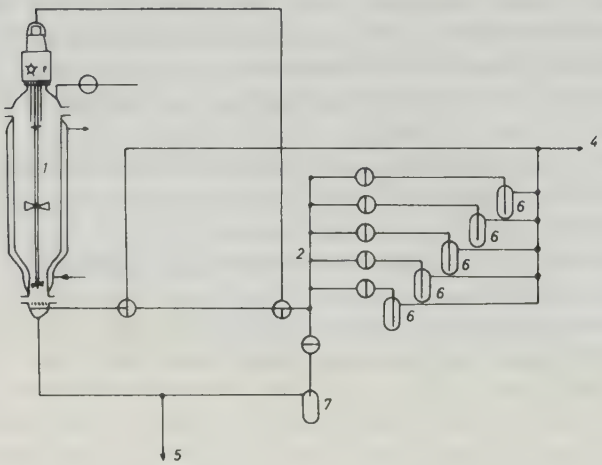
a) Eine Ringleitung am oberen Gefäßrand, die aus vielen kleinen Düsen die Gefäßwand und den Rührer mit Lösungsmittel benetzt.

b) Ein rotierendes Düsensystem, welches den gleichen Zweck erfüllt.

Die Entscheidung fiel zugunsten des zweiten Systems aus, weil es eine gleichmäßigere Benetzung der Wand gewährleistet und das Düsensystem in den Rührer integriert werden kann.

Als Rührerantrieb wurde ein Rotationsverdampfer (Büchi Rotavapor) gewählt. Der Antrieb wird mit der Kühlerseite auf den Gefäßdeckel geschraubt. Über die Gegenöffnung wird ein NS 45 Schliffkern aus V4A-Stahl geschraubt. Auf diesem Schliffkern steckt ein Kolben, in den ein Einleitungsstutzen eingeschmolzen ist, der in die Rührerwelle reicht. Zwei Gasdurchführungsrohre des Rotationsverdampfers wurden zu einem Rührer umgebaut, siehe Abb. 14.
Der Rührer wird oberhalb und unterhalb des Schliffkerns mit Simmerringen gegen das Antriebsgehäuse abgedichtet. Die Rührerwelle ist oben geöffnet und bis zu dem Spritzdüsensystem in Höhe des Deckelplanschliffs hohl. In die Öffnung der rotierenden Rührerwelle wird das Lösungsmittel gepumpt und dann durch den eigenen hydrostatischen Druck durch die Düsen an die Gefäßwand gespritzt.
Die Lösungsmittel und Reagentien werden durch Stickstoff aus den Vorratsbehältern in das Reaktionsgefäß gedrückt. Die Steuerung der Zugabe bzw. des Stickstoffdrucks und des Vakuums erfolgt über eine Hahnleiste (Abb. 15).

Abb. 15: Fließbild der Apparatur
1 Reaktionsgefäß, 2 Hahnleiste,
3 Belüftung, 4 Stickstoff, 5 Vakuum,
6 Lösungsmittel- und Reagentienbehälter



3.4.2. Vorversuche mit dem Synthesegerät

Die Simulation mehrerer Peptidsynthesezyklen mit reinem Polyäthylenglykol MG 20 000 in dem Synthesegerät verliefen zufriedenstellend. Das Polymer ließ sich gut fällen, abfiltrieren und vakuumtrocknen. Bei der Trocknung werden im Gefäß Unterdrücke von 15 Torr am Wasserstrahlvakuum erreicht.
Fällungsrückstände an der Gefäßwand und am Rührer wurden quantitativ mittels der Spritzdüsen gelöst.

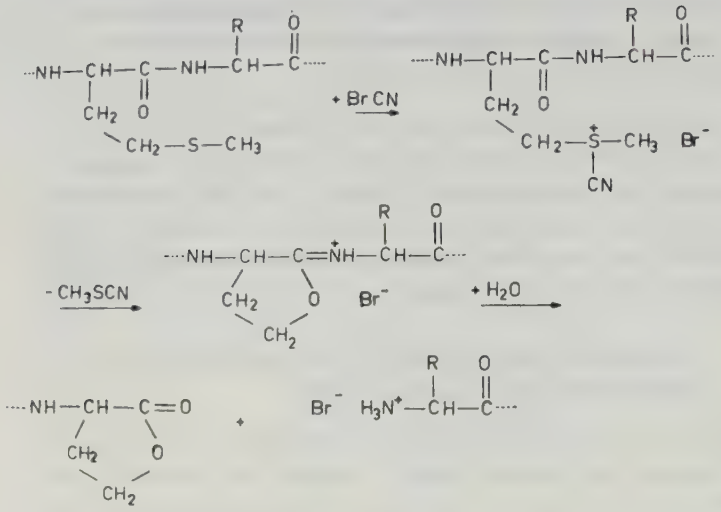
Wie schon in Kapitel III.1.2. beschrieben, erhitzte sich der Antriebsmotor infolge des hohen Reibungswiderstandes so stark, daß die Fettfüllungen der Getriebekugellager in den Reaktor liefen. Dieses Problem ließ sich auf die gleiche Weise wie in Kapitel III.1.2. lösen.

Ein Synthesezyklus läuft nach den in Kapitel III.3.2. beschriebenen Prinzipien ab. Die eine Hälfte der benötigten Menge an Trifluoressigsäure, Lösungs- und Fällungsmittel wird unten durch die Fritte in den Reaktor gedrückt, die andere Hälfte dient zur Spülung der Gefäßwände durch das im Rührer befindliche Düsensystem (Kapitel III.3.4.1.).

3.4.3. Synthese eines Oktapeptids der Sequenz PEG_{2000} Ala-Met-Asn-Cys-Tyr-Asn-Glu-Leu

Da die alkalische Spaltung des Polymerpeptidesters bei der Synthese der Insulin-A-Kette nur in sehr geringen Ausbeuten verlief und ein säurelabiler Anker noch nicht zur Verfügung stand, sollte mit dieser Synthese eine neue Ankergruppe getestet werden.
Neben enzymatischen Methoden gibt es auch einige spezielle chemische Methoden zur Spaltung längerer Peptidketten.
So spaltet Bromcyan (63,64) Peptidbindungen an der Carboxylfunktion von Methionin (Abb. 16).

Abb. 16



Diese Reaktion verläuft sehr spezifisch, so wird z.B. Cystin nicht angegriffen.
W. Busse und F. Carpenter benutzen das Carbonyl-bis-L-Methionin als Insulin-C-Analoga zur Rekombination der Insulin-A mit der B-Kette (65).
Nach erfolgter Rekombination wird das Carbonyl-bis-(L-methionyl)-Insulin mit Bromcyan gespalten.
Das Peptid sollte nach erfolgter Synthese mittels Bromcyan vom Träger abgespalten werden. Man erhält so das C-terminal um Homoserin verlängerte Peptid.
Das Homoserin kann mit dem Enzym Carboxypeptidase A abgespalten werden. Die Carboxypeptidase-A spaltet Homoserin sehr schnell ab, während die nächste Aminosäure, das Asparagin, nur sehr langsam angegriffen wird (66). Ein weitergehender Angriff auf das Peptid ist also nicht zu erwarten.

Durch diese Kombination der chemischen mit der enzymatischen Spaltung sollte eine Steigerung der Peptidausbeute erreicht werden. Gleichzeitig ergibt sich die Möglichkeit die Asparagin^{21,18}Insulin-A-Kette zu synthetisieren. Asparagin kann nur in so geringer Ausbeute als Ester an das Polyäthylenglykol gebunden werden,daß eine Synthese nicht lohnend erscheint.

Schutzgruppenwahl

Die Aminogruppe aller verwendeten Aminosäuren wurde mit der Boc-Gruppe geschützt.
Die -Carboxylfunktion der Glutaminsäure wurde mit der Benzylgruppe verestert.
Tyrosin wird als Benzyläther eingesetzt.
Cystein wurde als S-Isopropyl-Disulfid eingesetzt.
Als Carboxylschutzgruppe des Alanins diente Polyäthylenglykol MG 20 000.
Die Amidfunktion des Asparagins bleibt ungeschützt.
Die Kupplungen werden mit Dicyclohexylcarbodiimid als Kupplungsagens durchgeführt. Alle Aminosäureanhydride, bis auf das Asparagin, werden in Methylenchlorid separat dargestellt.
Asparaginsäure wird mit Dicyclohexylcarbodiimid und 1-Hydroxybenzotriazol in Tetrahydrofuran/Dimethylformamid voraktiviert.
Der Umsatz jeder Kupplung wird durch den Fluramtest ermittelt. Die Boc-Abspaltung erfolgt in 100%-iger Trifluoressigsäure. Bis zum Tetrapeptid wurde Methylenchlorid als Lösungsmittel verwendet. Bei den folgenden Stufen wurde das Polymerpeptid in einem Gemisch von Methylenchlorid und Dimethylformamid gelöst.
Löslichkeitsschwierigkeiten traten dadurch während des Syntheseverlaufs nicht auf.

Eine Aminosäureanalyse nach der letzten Kupplung ergab:

Hydrolyse 6n HCl, 24 h, 110° C

	Asp	Glu	Ala	Cys	Met	Leu	Tyr
theor.	2	1	1	1	1	1	1
prakt.	2	1,04	1,11	0,25	0,96	0,95	0,48

Bezogen auf Asp = 2

3.4.4. Aufarbeitung des Polymerpeptids

3.4.5. Die Bromcyanspaltung

Die Bromcyanspaltung wurde nach einer Analogvorschrift von E. Gross (64) in verschiedenen Ameisensäurekonzentrationen mit unterschiedlichen Bromcyan-Überschüssen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. In den Rückständen ließ sich abgespaltenes Peptid nur in geringen Mengen dünnschichtchromatographisch mittels Fluram nachweisen. Säulenchromatographisch ließ sich nach Trennversuchen über Sephadex G 25, Sephadex LH 20 und DEAE-Cellulose in keiner Fraktion abgespaltenes Peptid nachweisen.

3.4.6. Alakalische Hydrolyse

Der Polymerpeptidester wurde in 2n Kalilauge 4 h bei 25° C hydrolisiert. Im Hydrolysat ließ sich nur dünnschichtchromatographisch mittels Fluram Peptid nachweisen, Ninhydrin ergab keine Färbung.
In den Eluaten aus der Säulenchromatographie war kein Peptid nachweisbar.

3.4.7. Hydrazinolyse

Die methanolische Lösung des Polymerpeptids wird mit 100-fachem Überschuß an Hydrazinhydrat versetzt. Nach 48-stündi-

ger Hydrazinolyse ließ sich im Rückstand abgespaltenes Peptid nur in Spuren nachweisen.

3.5. Automatisierung des Synthesegerätes

Um die Leistungsfähigkeit des Synthesegerätes zu beweisen, soll versucht werden, den Ablauf einer Peptidsynthese zu automatisieren. Dazu muß die Steuerung der Lösungsmittel- und Reagentienzugabe, sowie die Druckregelung, über Magnet- oder Multiportventile erfolgen.
Die Steuerung der einzelnen Syntheseschritte kann von einem Steuerautomaten oder einem Prozeßrechner vorgenommen werden.

3.5.1. Wahl der Magnetventile

Wegen der aggresiven Medien müssen alle Teile des Magnetventils, die mit ihnen in Berührung kommen, aus Teflon sein. Das Magnetventil muß außerdem in einem Bereich von 0 - 2 bar druckdicht sein.
Das Totvolumen des Ventils soll so klein als möglich gehalten werden.
Die Wahl fiel auf ein Teflonmagnetventil der Firma Herion. Es zeigte in Vorversuchen eine gute Resistenz gegen die verwandten Lösungsmittel. Das Ventil wurde mehrere Tage mit Dimethylsulfoxyd, Hexamethylphosphorsäuretriamid und Trifluoressigsäure beschickt, ohne daß irgendwelche Zeichen von Korrosion auftraten. Auch die Vakuumdichtigkeit erwies sich als ausreichend (10 Torr am Wasserstrahlvakuum). Einige andere getestete Ventile zeigten entweder bei den Lösungsmitteln (besonders beim Hexamethylphosphorsäuretriamid) starke Auflösungserscheinungen, oder waren nicht vakuumdicht.

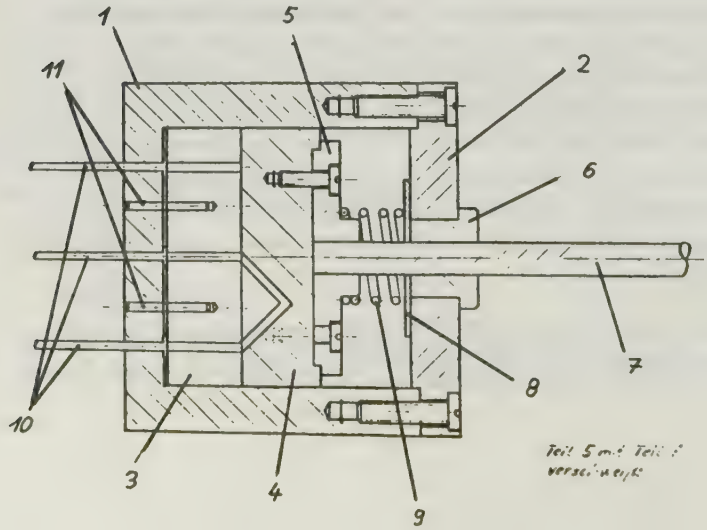
Als Steuerfunktion wurde "stromlos geschlossen" gewählt, da der größte Teil der Magnetventile während eines Syn-

thesezyklus nur kurz geöffnet ist.
Die Steuerspannung beträgt 220 V.
Die Magnetventile haben am Ventilsitz eine Nennweite von 10 mm.

3.5.2. Multiportventil

Die aktivierten Aminosäuren werden, wie in Kapitel III.3.4.2. beschrieben, durch die Rührerwelle in den Reaktor gepumpt. Die Zugaberegelung erfolgt über ein Multiportventil. Auch in diesem Ventil müssen alle Teile, die mit den Lösungsmitteln und Reagentien in Berührung kommen, aus Teflon sein. Da ein Ventil mit den passenden Bohrungen und der notwendigen Wegezahl nur schwer erhältlich ist und außerdem diese Ventile sehr teuer sind, wurde speziell für dieses Problem ein automatisches 13-Wegeventil entworfen und gebaut (Abb. 17).

Abb. 17: Multiportventil (Ventilkörper)
1 Ventilgehäuse, 2 Deckel, 3 Lochscheibe, 4 Verbindungsscheibe, 5 Mitnehmerplatte, 6 Wellenllager, 7 Antriebswelle, 8 Unterlagsscheibe, 9 Druckfeder, 10 Teflonschlauch, 11 Haltestift



In den Boden des zylindrischen Ventilgehäuses (1) sind kreisförmig um die Mittelpunktsbohrung 12 Löcher im Abstand von 30° gebohrt. Diese Bohrungen nehmen die Teflonanschlußschläuche auf. Im Innern befindet sich als Stator eine Lochscheibe (3) aus Teflon, die ebenfalls 13 Bohrungen enthält. Auf dem Stator dreht sich die Verbindungsscheibe (4), die zwei Schrägbohrungen enthält, welche die mittlere Bohrung mit einer seitlichen Bohrung verbindet. Der Rotor wird über die Mitnehmerscheibe (5) und die Welle (7) angetrieben. Rotor und Stator werden mit der Spiralfeder (9) fest auf den Gehäuseboden gepreßt.

Die Welle wird über ein doppeltes Schneckengetriebe 1:2500 von einem Elektromotor angetrieben. Nach einem kurzen Einschaltimpuls, ca. 2 sec, dreht der Motor den Rotor um 30° auf die nächste Bohrung und schaltet dann selbsttätig ab. Diese Steuerung erfolgt über eine Lochscheibe und einen Rollenschalter.

Der Betriebsdruck des Ventils beträgt 0 - 3 bar.

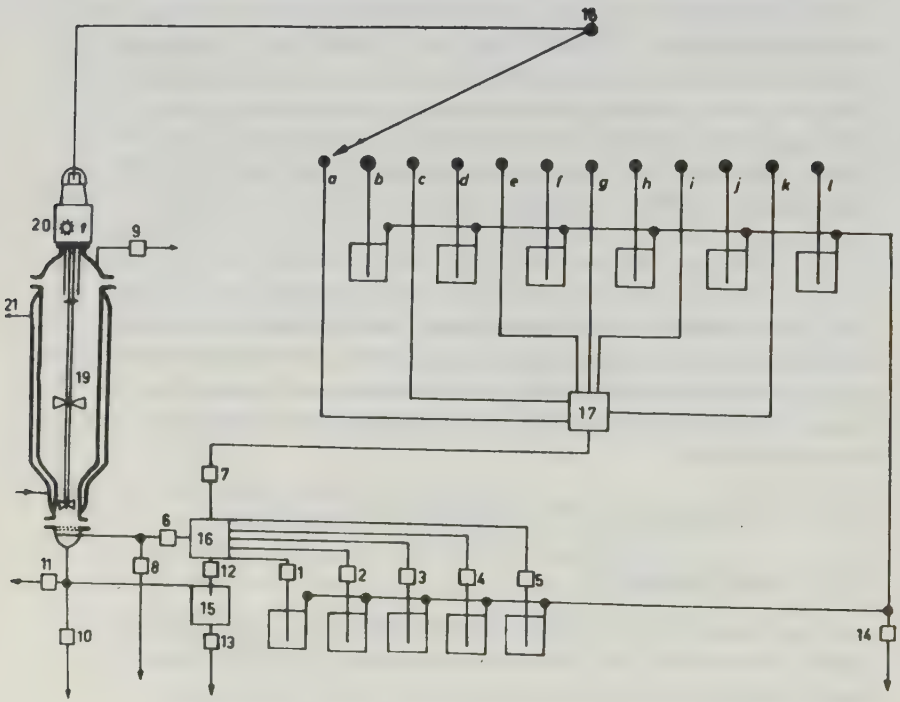
3.5.3. Das Steuergerät

Auf den Einbau eines automatischen Steuergerätes wurde vorläufig verzichtet, da sich die Versuchsanordnung mit den Magnetventilen und dem Multiportventil erst im Dauerbetrieb bewähren muß. Die Magnetventile, der Rührer und der Kältethermostat werden von einer Schalttafel manuell gesteuert.
Das Ein- und Abschalten der Magnetventile erfolgt über Wippschalter mit eingebauter Signallampe.

3.5.4. Aufbau der Apparatur

Die Abbildung 19 zeigt als Fließbild den Gesamtaufbau der Apparatur.

Abb. 18: Fließbild der halbautomatischen Syntheseapparatur



1-5 Vorratsbehälter und Magnetventile für Lösungsmittel,
6-7 Steuerventile für Einlaß Oben und Unten,
8 Stickstoffventil, 9-10 Belüftungsventile,
11-12 Vakuumventile, 13 Filtratablauf, 14 Stickstoffventil für Lösungsmittel- und Reagentienbehälter,
15 Auffanggefäß für das Filtrat, 16-17 Verteiler,
18 Multiportventil, 19 Reaktionsgefäß, 20 Rührer,
21 Kühlung/Heizung
a,c,e,g,i,h Einlaß für Lösungsmittel
b,d,f,h,j,l Einlaß für Aminosäuren

Die einzelnen Arbeitsvorgänge wie Lösen, Kuppeln, Fällen, Filtrieren und Trocknen in der Apparatur werden wie folgt gesteuert:

a) Lösen und Kuppeln

Zuerst sind alle Systeme geschlossen, dann werden der Reihe nach folgende Steuerbefehle über die entsprechenden Schalter der Schalttafel gegeben.

Ventil 14 an:	Es setzt die Lösungsmittelbehälter unter Stickstoffdruck.
Ventil 1, 6 und 9 an, Rührer 20 und Heizung 21 an:	Lösungsmittel wird durch die Fritte in das Gefäß gepumpt. Nachdem die Hälfte des Lösungsmittels abgepumpt ist;
Ventil 1 und 6 aus, Ventil 8 an, Multiport 18 auf b:	Stickstoff perlt durch die Fritte. Die aktivierte Aminosäure wird durch den Rührer in das Gefäß gepumpt.
Multiport 18 auf c, Ventil 1 und 7 an:	Das restliche Lösungsmittel wird in den Reaktor gepumpt.
Ventil 1, 7 und 14 aus.	

Ein reiner Lösungsvorgang muß genauso gesteuert werden. Das Multiportventil wird dabei aber nicht auf ein Aminosäurenreservoir weitergeschaltet.
Bei der Schutzgruppenabspaltung ist wie beim Lösen zu verfahren.

b) Fällen

Zu Beginn des Fällungsvorganges sind die Systeme geöffnet, die auch am Ende des Lösungsvorganges geöffnet sind (die Ventile 8 und 9, die Heizung 21 und der Rührer 20).

Ventile 14, 2 und 6 an, Ventil 8 aus, Heizung auf Kühlung umschalten:	Die Hälfte des Fällungsmittels wird durch die Fritte in den Reaktor gepumpt.
Ventil 6 aus, Ventil 8 und 7 an, Ventil 7,2 und 14 aus:	Der Rest des Fällungsmittels wird durch den Rührer in das Gefäß gepumpt. Durch die Lösung perlt Stickstoff. Sie wird weiterhin gerührt und gekühlt bis sämtliches Polymerpeptid ausgefallen.

c) Filtrieren

Nach vollendeter Fällung, vor Beginn der Filtration sind folgende Systeme geöffnet: die Ventile 8 und 9, Kühlung 21 und Rührer 20.

Ventil 8 aus, Ventile 6,12 und 11 an:	Der Raum unter der Fritte wird evakuiert. Das Filtrat läuft über den Verteiler 16 in den Behälter 15.

Nach beendeter Filtration:

Ventile 6 und 12 aus,
Ventil 10 an,
Ventil 11 aus,
Rührer 20 aus,
Kühlung auf Heizung
umstellen.

Der Waschvorgang des Filtrats ist prinzipiell so zu steuern wie Lösen mit anschließender Filtration, die Heizung bleibt dabei angeschaltet. Zum Umfällen werden die Operationen a - c wiederholt.

d) Trocknen

An die Filtration schließt sich die Trocknung an. Am Anfang sind folgende Systeme geöffnet: Ventil 9 und 10 an.

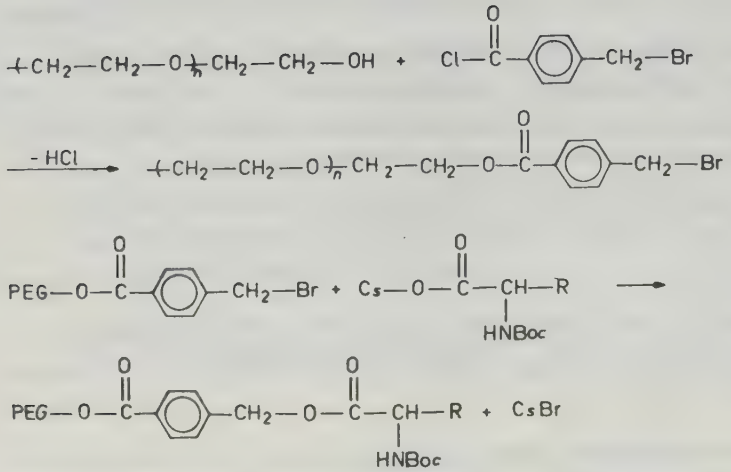
Ventil 13 an, Ventil 9,10 u.13 aus:	Das Filtrat läuft aus dem Sammelbehälter.
Ventile 6,12 und 11 an:	Das Gefäß wird evakuiert und der Niederschlag getrocknet.
Ventile 9 und 10 an, Ventile 6,12 und 11 aus:	Das Gefäß kann statt mit Luft auch mit Stickstoff belüftet werden, dann gelten folgende Befehle:
Ventile 6 und 12 aus, Ventile 8 und 10 an, Ventil 11 aus:	Das Gerät steht jetzt unter schwachem Stickstoffüberdruck.

Die Peptidsynthese läuft jetzt weiter mit einer Kupplung oder Abspaltung. Für die Weiterführung gelten sinngemäß die Befehle a - d.

3.5.5. Synthese eines Tetrapeptids der Sequenz H-Gly-Phe-Val-Ala-OH

Dieses Peptid wurde in der Syntheseapparatur an einer säurelabilen Ankergruppierung am Polyäthylenglykol synthetisiert. Das modifizierte Polyäthylenglykol läßt sich nach H. Albrecht (37) aus Polyäthylenglykol und p-Brommethylbenzoylchlorid darstellen (Abb. 19).

Abb. 19



Das entstandene Bis-(p-Brommethylbenzoyl)-Polyäthylenglykol wird mit dem Caesiumsalz der gewünschten Boc-Aminosäure in Dimethylformamid zum entsprechenden Aminosäurebenzylester umgesetzt. An diese erste Aminosäure läßt sich das Peptid nach den üblichen Methoden weiter aufbauen.

Als Carboxylschutzgruppe wurde Bis(p-Brommethylbenzoyl)-Polyäthylenglykol MG 20 000 mit N-Boc Alanin verestert. Gekuppelt wurde mit den symmetrischen Anhydriden der Boc-Aminosäuren, welche separat mit Dicyclohexylcarbodiimid in Methylenchlorid dargestellt wurden.
Als direkte Umsatzkontrolle diente der qualitative Fluramtest.

Die Aminoschutzgruppe wurde in 100%-iger Trifluoressigsäure abgespalten.

Ein Reaktionszyklus lief in der halbautomatisierten Syntheseapparatur nach den in Kapitel III.3.5.4. formulierten Steuerbefehlen ab. Während der Synthese traten keine Löslichkeitsschwierigkeiten auf. Die Kupplungsausbeuten waren laut Fluramtest und Aminosäureanalyse nahezu quantitativ. Die Gesamtausbeute an Polymerpeptid bezogen auf das eingesetzte Polymer betrug 95%. Die fehlenden 5% lassen sich durch die Probenentnahme und durch Verluste bei der Entnahme des fertigen Polymerpeptids aus dem Synthesegefäß erklären.

Die Aminosäureanalyse des Polymertetrapeptids ergab:

Hydrolyse: 6n HCl, 24 h, 110° C

	Gly	Ala	Val	Phe
theor.	1	1	1	1
gef.	0,97	1	0,96	1,02

Bezogen auf Ala = 1

3.5.6. Abspaltung und Charakterisierung des Peptids

Das Peptid wurde hydrogenolytisch in Methanol/Eisessig vom Polymer abgespalten. Das wasserunlösliche Peptid konnte aus wässriger Lösung direkt abfiltriert werden.

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

1. Synthesegerät nach dem Rotationskolbenprinzip

Dieses Synthesegerät wurde soweit entwickelt, daß nach Einbau entsprechender Steuer- und Regelelemente Peptidsynthesen nach der Liquid-Phase-Methode automatisch ablaufen können.

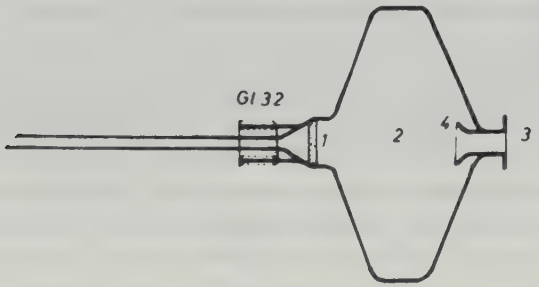
Am Antrieb und am Reaktionskolben müssen allerdings noch einige Verbesserungen durchgeführt werden, damit ein reibungsloser Ablauf der Synthese gewährleistet ist.
Der Motor wird trotz Kühlung noch immer so heiß, daß nach einiger Zeit Schäden am Motor und Getriebe auftreten.
Nach der Synthese des Pentapeptids H-His-Phe-Phe-Val-Gly-OH brannte bei einem Probelauf die Feldwicklung des Motors durch.
Zur Lösung dieses Problems bieten sich zwei Möglichkeiten an.

a) Einbau eines stärkeren Motors.

b) Kontruktion eines Zusatzgetriebes zwischen Motor und Getriebeteil.
   Durch die Wahl eines geeigneten Übersetzungsverhältnisses des Getriebes kann der Motor bei maximaler Umdrehungszahl unter Vollast laufen. Dadurch wird eine Überhitzung vermieden.

Durch den Übergang des Kolbens zum Antrieb läuft während der Rotation ein geringer Teil der Reaktionslösung in den Antrieb und setzt die Lebensdauer der dichtenden Teile erheblich herab. Dieser Mangel kann durch den Einbau einer Manschette am Kolbenhals behoben werden (Abb. 20).
Der Kolben soll außerdem die in der Abbildung gezeigte Form erhalten, um ein besseres Verhältnis Volumen/Durchmesser zu bekommen.

Abb. 20: Rotationskolben
1 Fritte, 2 Kolben, 3 Anschlußflansch,
4 Manschette



Das konstruierte V4A-Gegenlager zeigte nach mehrwöchigem Dauerbetrieb keinerlei Abnutzungserscheinungen. Simmerringe und Kugellager befanden sich noch in einem sehr guten Zustand. Dieses Lagerteil war noch hochvakuumdicht (10^{-2} Torr) und ist nicht verbesserungsbedürftig.

Erhebliche Probleme bereitet noch die Thermostatisierung des Rotationskolbens. Der Kolben rotiert in einem offenen Bad und wirkt auf die Flüssigkeit(Methanol/Wasser 1:1) wie ein Walzentrockner. Der Flüssigkeitsverlust in dem Bad ist erheblich, ca 2 l pro Tag.
Aus diesem Grunde sollte man die Möglichkeit in Erwägung ziehen, die Thermostatisierung ganz wegzulassen. Auf eine Heizung könnte verzichtet werden, da sich die Raumtemperatur in dem Gefäß von selbst einstellt. Eine Kühlung kann durch Abziehen eines Teiles des Fällungsmittels im Vakuum erreicht werden. Die Verdampfungswärme wird dem Kolbenin-

halt entzogen. Man kann so Temperaturen unter 0° C erreichen.
Ein erheblicher Nachteil dieser Methode besteht aber darin, daß überschüssiges Lösungsmittel und das Abspaltungsagens nur sehr langsam abdestilliert werden.
Dieses Problem bedarf noch einer genaueren Prüfung.

Trotz dieser Mängel konnte die Leistungsfähigkeit des Systems durch die Synthese zweier Peptide bewiesen werden.
Abschließend soll noch gesagt werden, daß die Verwendungsmöglichkeit der Apparatur nicht nur auf die Peptidsynthesen nach der Liquid-Phase-Methode begrenzt ist. Sie kann auf alle Synthesen angewandt werden, bei denen ein Reaktionsprodukt unlöslich wird oder ausfällbar ist.

2. Synthesegerät nach dem alternierenden Druckprinzip

Als Alternative zu dem Rotationskolbensynthesegerät wurde ein anderes System zur Automationsreife entwickelt.
In den verschiedenen Prototypen dieses Gerätes wurden mehrere Peptide synthetisiert.
Der letzte Prototyp wurde so ausgebaut, daß zur Automation nur noch die Steuereinheit fehlt.

Im Dauerbetrieb treten auch bei diesem Prototyp noch Mängel am Rührer und Rührerantrieb auf.
Der Antriebsmotor wird bei Dauerbelastung noch immer zu warm. Dieses Problem läßt sich durch den Einbau eines stärkeren Motors lösen.
Ein weiteres Problem ist die Abdichtung der Rührerwelle. Bis jetzt steht für die Rührerwelle noch kein KPG-Rohr zur Verfügung. Die jetzige Rührerwelle verschleißt infolge ihrer Fehler die Simmerringe zu schnell. Die Vakuumdichtigkeit läßt nach ca. 50 Betriebsstunden so stark nach, daß eine Vakuumtrocknung nicht mehr möglich ist.

Dieser Fehler läßt sich auf zwei Arten beheben:

a) Verwendung einer KPG-Rührerwelle.

b) Konstruktion eines anderen Rührers.
Man kann einen KPG-Rührer verwenden, der mit einem Exzenter über einen Motor so angetrieben wird, daß er sich nicht mehr dreht, sondern nur noch Hin- und Herbewegungen um 180° macht. Auf die hohle Rührerwelle wird ein Teflonschlauch geschraubt, der bis zum Multiportventil führt. Dieser Schlauch muß die 180°-Bewegung ausgleichen können. Auch durch dieses System wäre eine gleichmäßige Benetzung der Gefäßwand gewährleistet.

Die endgültige Leistungsfähigkeit des Synthesegerätes kann nur durch die vollautomatische Synthese mehrererOligopeptide bewiesen werden.
Auch die Verwendungsmöglichkeiten dieses Systems sind nicht nur auf die Peptidsynthese nach der Liquid-Phase-Methode begrenzt.

3. Gegenüberstellung und Vergleich der beiden Synthesegeräte

Der Einfachheit halber wird das Synthesegerät nach dem Rotationskolbenprinzip in diesem Kapitel nur A und das andere Gerät nur B genannt.

B ist leichter zu automatisieren, einfacher im Aufbau und hat einen geringeren Platzbedarf.
In A lassen sich Peptide synthetisieren, bei denen das Polymerpeptid mit wachsender Kettenlänge unlöslich wird. Bei B muß die Synthese in dem Moment abgebrochen werden, in dem sich die Fällungsrückstände nicht mehr mit wenig Lösungsmittel von der Gefäßwand spülen lassen.
In A sind Vakuumdestillationen leicht möglich. In B sind sie theoretisch zwar möglich, aber technisch kaum durchführbar.
Es sind in dem einen Gefäß Synthesen möglich, die in dem

anderen nicht durchgeführt werden können. Man kann also von Fall zu Fall abwägen, welches Systems man sich bedient.

4. Die Synthese der Insulin-A-Kette

Der stufenweise Aufbau der Insulin-A-Kette am löslichen, polymeren Träger nach der Liquid-Phase-Methode ist ohne Schwierigkeiten möglich. Kupplungen können, in Dimethylformamid und Diemthylsulfoxyd, ohne erhöhte Racemisierungsgefahr durchgeführt werden. Die $Ala^{21,18}$-Sequenz der Insulin-A-Kette wurde in dem Synthesegerät nach dem Rotationskolbenprinzip dargestellt. Der weitere Aufbau zum Heneikosapeptid erfolgte manuell.

Die geringen Hydrolyseausbeuten können nur durch eine hydrophobe Abschirmung der Alanin-Polyäthylengylkol-Esterbindung erklärt werden. Ein Kalottenmodell der ersten sechs Aminosäuren der vollgeschützten Insulin-A-Kette zeigt, daß eine Sekundärstruktur möglich ist, bei der sich die Benzylschutzgruppen des Cysteins, Tyrosins und der Glutaminsäure in Form einer hydrophoben Tasche um den Alaninester legen können.
Diese Hydrolyseresistenz zeigte sich bei dem in Kapitel III.3.4.3. - III.3.4.7. beschriebenen Peptid in noch stärkerem Maße. Bei diesem Polymerpeptid ließen sich die Hydrolyseprodukte nur noch dünnschichtchromatographisch mittels Fluramtest nachweisen.
Wegen der geringen Menge an Rohpeptid mußte auf die Reinigung der synthetischen Insulin-A-Kette über das Tetrathiosulfat verzichtet werden.
Die Rekombination der Tetra-S-Benzyl-A-Kette mit dem natürlichen B-Ketten-Dithiosulfat erfolgte nach einer älteren Vorschrift von H. Zahn (57).
Nach dieser Methode rekombinierte Insuline zeigen, hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität, eine große Streuung.

Ein endgültiges Urteil kann erst nach mehreren Tests, für die nicht genug Substanz vorhanden war, getroffen werden. Das Hybridinsulin zeigte nach diesem Test keine biologische Aktivität.
Die physikalischen Daten aus der Niederspannungs-Elektrophorese und der UV- und IR-Spektroskopie (siehe Kapitel V.6.7.) zeigten eine gute Übereinstimmung mit dem natürlichen Insulin.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Akürzungen

In dieser Arbeit wurden folgende Abkürzungen benutzt:

AS	Aminosäure
ASA	Aminosäureanalyse
Boc	t-Butyloxycarbonyl-
CH_2Cl_2	Methylenchlorid
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DC-Harnstoff	Dicyclohexylharnstoff
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxyd
h	Stunden
HAc	Essigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
LPM	Liquid-Phase-Methode
mmol	Millimol
min	Minuten
NMM	N-Methylmorpholin
PP	Polymerpeptid = Polyäthylenglykol-Peptidylester
PEG_x	Polyäthylenglykol (X x 1000 = MG)
RT	Raumtemperatur
SIP	S-Isopropyl
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
V4A	Edelstahl 17,5 % Cr 2,25 % Mo 11,5 % Ni

Die Aminosäuren und die anderen Begriffe sind nach den IUPAC-Regeln abgekürzt (86).

2. Verwendete Geräte

IR-Spektrograph Perkin-Elmer Infracord
UV-Spektrometer Beckman DK II
Aminosäureanalysator Beckman Unichrom
Aminosäureanalysator Beckman Multichrom
pH-Meter und Dosimat Fa. Metrohm, Herisau
UVIS UV-Lampe Fa. Desaga
Fraktionssammler LKB 7000 Ultrorac mit optischer Einheit Uvicord I und Uvicord III
Fraktionssammler mit optischer Einheit UA 5 ISCO
Autotitrator TTT1 Radiometer Copenhagen mit Schreiber Typ SBR 2c

Für die Syntheseapparaturen wurden folgende Geräte und Einzelteile verwandt:

Rotationsverdampfer Büchi Rotavapor R
Rotationsverdampfer Bücho Rotavapor EL
Kältekleinthermostat Lauda K2R Elektronic
Ultrakryostat Lauda UK 70
Teflonmagnetventile Fa. Herion 09 33003.2508
Kugellager 6009 2RS
Vitonsimmerringe 22x36x8
Hydrametallbalg Metallschlauchfabrik Pforzheim

Alle anderen mechanischen und elektrischen Teile wurden von der Feinmechanikerwerkstatt des Chemischen Instituts hergestellt.
An dieser Stelle möchte ich den Herren Fassnacht, Groß, Kannwischer und Stumpp für die Präzision und Schnelligkeit danken, mit der diese Teile gefertigt wurden.
Die verschiedenen Reaktionsgefäße wurden von der Firma Bachofer, Reutlingen angefertigt. Ich danke besonders dem Glasbläser, Herrn Saur, für die Geduld und Mühe, die er bei der Fertigung dieser Gefäße aufbrachte.

3. Chemikalien und Lösungsmittel

Während der Synthesen wurden nur absolute Lösungsmittel verwandt.

Methylenchlorid wird über K_2CO_3 destilliert und über Molekularsieb 4 Å aufbewahrt.
DMF wird durch azeotrope Destillation (1 l DMF, 120 ml Benzol und 50 ml H_2O) vorgetrocknet und anschließend über CaH_2 destilliert.
Diäthyläther wird über $CaCl_2$ vorgetrocknet und über Na-Dispersion destilliert.
Essigsäure wird über P_4O_{10} vorgetrocknet und anschließend destilliert.
DCCI wird im Hochvakuum destilliert und als 2m Lösung in Methylenchlorid eingesetzt.
Das PEG stammt von den Firmen Roth, Chemische Werke Hüls und Höchst. Es wird vor Gebrauch zweimal mit Äther aus CH_2Cl_2 umgefällt und am Hochvakuum getrocknet.
Die Aminosäuren lieferte Fa. Merck.
Fluram wurde bei Hoffman La Roche gekauft.
Sephadex G25 medium und LH 20 stammte von der Fa. Pharmacia.
DC-Platten Kieselgel 60 mit und ohne Fluoreszenzindikator wurden ebenfalls von der Fa. Merck bezogen.
Boc-Azid wurde nach L. Carpino (67) synthetisiert.
HOBt (68,69,70) wird aus o-Nitrochlorbenzol und Hydrazinhydrat hergestellt.

4. Aminosäurederivate

Folgende Boc-Aminosäuren wurden nach der pH-Stat-Methode von E. Schnabel (71) hergestellt.

Boc-Ala, Boc-Asn, Boc-Cys(Bzl), Boc-Gln, Boc-Glu(Bzl), Boc-Gly, Boc-Ile, Boc-Leu, Boc-Met, Boc-Phe, Boc-Ser(Bzl) Boc-Tyr(Bzl), Boc-Val.

Weiterhin wurde synthetisiert $(Boc)_2$-His (85), Boc-Cys(SIP) (72).
Von den trifunktionellen Aminosäuren wurden folgende Derivate hergestellt:
Cysteinisopropyldisulfid (72), S-Benzylcystein (73), Glutaminsäure-benzylester (74), O-Benzyl-tyrosin (75).

Die Schmelzpunkte und Drehwerte entsprachen innerhalb geringer Toleranzen den Literaturangaben.

5. Allgemeine Arbeitsverfahren

5.1. Aminosäureanalysen

ca. 2 µmol Peptid werden genau in ein Hydrolyseröhrchen eingewogen und mit 3 - 4 ml 6n HCl versetzt, Bei schwer löslichen Polymerpeptiden wird noch 20 % TFA zugegeben. Ein geringer Zusatz von Phenol erbringt bei tyrosinhaltigen Peptiden bessere Ergebnisse.
Die Lösung wird in flüssigem N_2 eingefroren und das Röhrchen am Hochvakuum zugeschmolzen. Die Hydrolyse erfolgt während 24 h bei 110° C.
Die Lösung wird anschließend im Vakuum bis zur Trockne eingeengt.
Der Rückstand wird nach Spackmann und Moore (76) analysiert.

5.2. Dünnschichtchromatographie

Folgende Systeme wurden eingesetzt:
A Butanol : Eisessig : Wasser = 3 : 1 : 1
B Chloroform : Methanol = 7 : 3
C Chloroform : Methanol : Eisessig : Wasser = 60 : 45 : 6 : 14

Fluram (78) : auf Aminogruppen
Ninhydrinreagens (77) : auf Aminogruppen
Chlor-Tolidin-Reagens (77) : auf Peptidbindungen
Dragendorff-Bürger-Reagens (77) : auf PEG

Die Tests auf die Aminogruppen und die Peptidbindung können der Reihe nach auf der gleichen DC-Platte vorgenommen werden. Der Test auf die Abwesenheit niedermolekularer Überschüsse im Polymerpeptid wurde immer im Laufmittel A durchgeführt.

5.3. Aktivierung der N-Boc-Aminosäuren

a. Die symmetrischen Anhydride

In eine 20%-ige eisgekühlte Lösung der Boc-Aminosäure in CH_2Cl_2 pipettiert man die 2M DCCI-Lösung (Mol-Verhältnis 2 : 1). Die Lösung wird unter Rühren 15 min bei 0° C und 15 min bei RT voraktiviert. Anschließend wird vom ausgefallenen DC-Harnstoff abfiltriert.
Bei der Synthese der Insulin-A-Kette, des Oktapeptids Ala-Met-Asn-Cys-Tyr-Asn-Glu-Leu, des Pentapeptids Gly-Val-Phe-Phe-His und des Tetrapeptids Ala-Val-Phe-Gly wurde 1 mmol Boc-Aminosäure im Überschuß zugesetzt.

b. Die HOBT/DCCI Aktivierung

Diese Methode wurde nur beim Boc-Asn angewandt, um die Nitrilbildung zu verhindern.
Boc-Asn wird bei 0° C in 20 ml THF und 10 ml DMF mit HOBT und DCCI versetzt (Mol-Verhältnis 1:1:1). Man läßt 30 min bei 0° C und 10 min bei RT reagieren und filtriert dann den ausgefallenen DC-Harnstoff ab.

5.4. Die Kupplung

Zu einer 10%-igen Lösung des PP in CH_2Cl_2, DMF, DMSO oder Gemischen aus diesen Lösungsmitteln gibt man die klare Lösung der aktivierten Aminosäure. Nähere Angaben über die Mengenverhältnisse geben die entsprechenden Tabellen. Anschließend wird die Lösung mit NMM neutralisiert. Man kann die Base auch schon zu der aktivierten Aminosäure geben.

Nach 15 min wird eine Probe der Lösung auf einer DC-Platte Kieselgel 60 im System A chromatographiert. Die Platte wird mit Fluram entwickelt. Zeigt der Startfleck keine Fluoreszenz, ist der Umsatz größer als 99%.
Nach zwei Stunden wird das PP mit Äther gefällt, abfiltriert und mit Äther gewaschen. Das PP wird so oft umgefällt, bis im DC keine niedermolekularen Überschüsse feststellbar sind. Anschließend wird das gereinigte PP im Vakuum getrocknet.

5.5. Die Boc-Abspaltung

Eine 10%-ige Lösung des PP in 100%-iger TFA oder 1,2n HCl/HAc werden 20 - 40 min bei RT gerührt. Anschließend wird das PP mit Äther gefällt, abfiltriert und mit Äther gewaschen. Nach zweimaligem Umfällen aus CH_2Cl_2, DFM oder DMSO wird es am Vakuum getrocknet.

6. Synthese der $Ala^{21,18}$-Insulin-A-Kette

6.1. Veresterung von PEG_{20} mit Boc-Ala

Zu 30 g PEG_{20} in 150 ml CH_2Cl_2 und 5 ml Pyridin werden 15 mmol mit DCCI/HOBT voraktiviertes Boc-Ala gegeben. Diese Lösung wird 40 h bei 40° C gerührt. Anschließend wird der PEG-Alanylester mit Äther gefällt und aus CH_2Cl_2 noch zweimal umgefällt. Der gereinigte PEG-Alanylester wird bei 10^{-1} Torr getrocknet.
Ausbeute: 28 g = 93%
Beladung: 83% laut ASA

6.2. Stufenweise Synthese der Insulin-A-Kette

Der PEG-Alanylester wird stufenweise nach den Vorschriften V.5.4. und 5.5. verlängert.
Das Heptapeptid wird in der Syntheseapparatur nach dem

Rotationskolbenprinzip dargestellt. Der weitere Aufbau zum Heneikosapeptid erfolgt manuell.
Eine Übersicht über das Syntheseschema und die Aminosäureanalysen geben Tabelle 1 und 2.

Tabelle 2: Aminosäureanalysen der einzelnen Syntheseschritte

Peptid	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Tyr	Cys	Beladung
1				1						83 %
2				1					+	76 %
3				1				0,71 (1)	+	81 %
4				2				0,61 (1)	+	78 %
5		0,83 (1)		2				0,39 (1)	+	75 %
6		0,85 (1)		2			0,95 (1)	0,35 (1)	0,76 (1)	84 %
7		1,82 (2)		2			1,04 (1)	0,47 (1)	0,46 (1)	81 %
8		1,80 (2)		2			0,97 (1)	1,04 (2)	0,80 (1)	86 %
9		1,64 (2)		2			2,03 (2)	1,13 (2)	0,92 (1)	83 %
10	0,91 (1)	1,74 (2)		2			1,96 (2)	0,97 (2)	+	85 %
11	0,69 (1)	1,92 (2)		2			1,72 (2)	0,79 (2)	1,05 (2)	78 %
12	0,69 (1)	1,60 (2)		2	1,01 (1)		2,04 (2)	0,82 (2)	1,92 (2)	80 %
13	1,53 (2)	1,82 (2)		2	0,68 (1)		2,11 (2)	1,32 (2)	+	79 %
14	1,68 (2)	1,90 (2)		3	0,81 (1)		2,06 (2)	0,45 (2)	+	81 %
15	1,60 (2)	1,82 (2)		3	0,61 (1)		1,84 (2)	0,56 (2)	2,10 (3)	72 %
16	1,29 (2)	1,69 (2)		3	0,51 (1)		1,68 (2)	0,59 (2)	4,13 (4)	83 %
17	1,30 (2)	2,59 (3)		3	0,52 (1)		1,66 (2)	0,65 (2)	4,14 (4)	80 %
18	1,21 (2)	3,65 (4)		3	0,89 (1)		2,03 (2)	0,26 (2)	3,40 (4)	72 %
19	1,42 (2)	3,85 (4)		3	1,85 (2)		1,95 (2)	0,62 (2)	3,76 (4)	83 %
20	1,27 (2)	3,55 (4)		3	1,25 (2)	0,45 (1)	2,15 (2)	0,52 (2)	3,55 (4)	79 %
21	1,55 (2)	3,66 (4)	0,85 (μ)	3	1,01 (2)	0,33 (1)	1,94 (2)	0,58 (2)	3,67 (4)	82 %

+ nicht bestimmt

Tabelle 1: Synthesebedingungen

PEG_{20}	Gramm Polymerpeptid	Kupplung mit Derivat	Überschuß Anhydrid ml	Kupplung in	ml Lösungsmittel	Dauer	Zahl der Fällungen	BOC-Abspaltung ml Lösungsmittel	Dauer	Zahl der Fällung
Ala^{21}	20	Boc-Cys(Bzl)	4	CH_2Cl_2	200	2 h	2	200 ml 1,2n HCl/HAc	20 min	3
Cys^{20}		Boc-Tyr(Bzl)	4	CH_2Cl_2	200	2 h	2	200 ml 1,2n HCl/HAc	20 min	3
Tyr^{19}		Boc-Ala	4	CH_2Cl_2	200	2 h	2	200 ml 1,2n HCl/HAc	20 min	3
Ala^{18}		Boc-Glu(Bzl)	4	CH_2Cl_2/DMF	100/100	2 h	2	200 ml 1,2n HCl/HAc	20 min	3
Glu^{17}		Boc-Leu	4	CH_2Cl_2/DMF	100/100	2 h	2	200 ml 1,2n HCl/HAc	30 min	3
Leu^{16}		Boc-Gln	4	CH_2Cl_2/DMF	100/100	2 h	3	200 ml 1,2n HCl/HAc	30 min	3
Gln^{15}	15,5	Boc-Tyr(Bzl)	3	CH_2Cl_2/DMF	75/75	2 h	3	200 ml 1,2n HCl/HAc	30 min	3
Tyr^{14}	14,6	Boc-Leu	3	CH_2Cl_2/DMF	75/75	2 h	2	150 ml 1,2n HCl/HAc	30 min	3
Leu^{13}	13,9	Boc-Ser(Bzl)	3	DMF	100	2 h	2	150 ml 1,2n HCl/HAc	30 min	3
Ser^{12}	13,5	Cys(Bzl)	3	DMF	100	2 h	3	250 ml 1,2n HCl/HAc	60 min	3
Cys^{11}	13,2	Boc-Val	3	DMF	100	2 h	3	100 ml TFA	30 min	3
Val^{10}	12,9	Boc-Ser(Bzl)	3	DMF	100	2 h	3	100 ml TFA	30 min	3
Ser^{9}	12,6	Boc-Ala	3	DMF	100+400	2 h	3	100 ml TFA	30 min	3
Ala^{8}	12,4	Boc-Cys(Bzl)	3	DMF	200	2 h	3	100 ml TFA	40 min	3
Cys^{7}	12,3	Boc-Cys(Bzl)	3	DMF/DMSO	140/20	2 h	3	100 ml TFA	40 min	3
Cys^{6}	12,2	Boc-Gln	3	DMF/DMSO	120/60	2 h	3	100 ml TFA	40 min	3
Gln^{5}	12,2	Boc-Glu(Bzl)	3	DMF/DMSO	100/100+100	2 h	3	100 ml TFA	45 min	3
Glu^{4}	12,3	Boc-Val	3	DMF/DMSO	50/100+100	2 h	3	100 ml TFA	45 min	3
Val^{3}	12,3	Boc-Ile	3	DMSO	150	2 h	3	100 ml TFA	45 min	3
Ile^{2}	12,2	Boc-Gly	3	DMSO	200-50	2 h	3			
Gly^{1}	12,2									

6.3. Hydrolyse des Peptidesters* (79)

Eine 10%-ige Lösung des Peptidesters in DMSO/1nNaOH wird 3 h bei RT gerührt und dann mit 1n HCl auf pH 5 angesäuert. Die Lösung wird mit dest.H_2O auf das fünffache Volumen verdünnt und der Niederschlag abzentrifugiert.
Das Zentrifugat wird zweimal mit wässriger HAc pH5 suspendiert und wieder zentrifugiert. Anschließend wird es in Wasser suspendiert und lyophilisiert.

6.4. Abspaltung der O-Benzylschutzgruppen

Zu dem in TFA gelösten Lyophilisat gibt man den 100-fachen Überschuß an Anisol. Durch diese Lösung wird 1 h Bromwasserstoff geleitet. Aus dieser Lösung wird das Peptid mit Äther gefällt. Die Suspension wird am Rotationsverdampfer eingeengt und anschließend zentrifugiert. Das Zentrifugat wird zweimal mit Methanol/Äther 1:6 gewaschen und anschließend am Ölvakuum (10^{-1} Torr) getrocknet.

Zur Gelfiltration wird das Zentrifugat wie folgt aufbereitet:

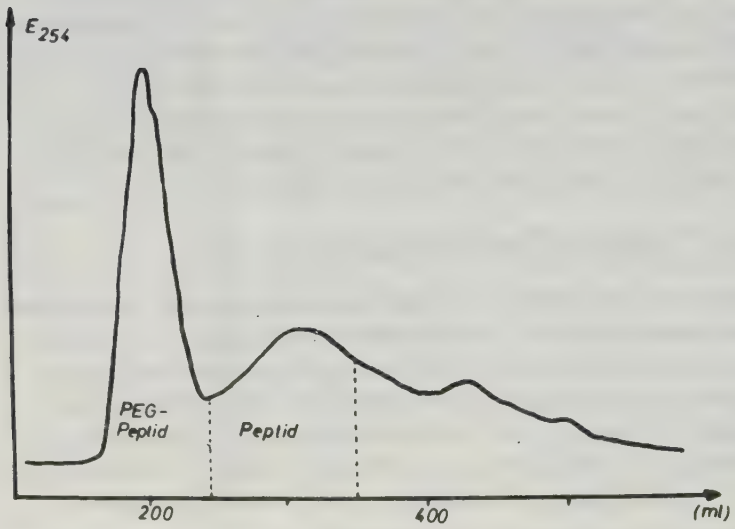
250 mg Zentrifugat und 240 mg Trishydroxymethyl-aminomethan werden 25 ml H_2O gelöst. Die Lösung wird mit verd. HNO_3 auf pH 8,6 eingestellt. Nach 12-stündigem Stehenlassen wird der Niederschlag abgetrennt und die klare Lösung chromatographiert.

Säule: 2,5 x 120 cm Sephadex G25 medium in 0,1 m Trispuffer pH 8,6
Elutionsmittel: 0,1 m Trispuffer pH 8,6
Auftragsmenge: 4 ml Lösung
Elutionsdiagramm: Siehe Abb. 21

---

* Ich danke Herrn Woiwode für die Durchführung der Aufarbeitung.

Abb. 21: Elutionsdiagramm der Tetra-S-Benzyl-A-Kette



Die vereinigten Peptidfraktionen werden mit verd. HNO_3 auf pH 3 angesäuert, eingeengt, 6 h gegen dest. H_2O dialysiert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wird noch zweimal auf der gleichen Säule chromatographiert.

Ausbeute: 90 mg Rohprodukt ergaben 23 mg Lyophilisat

Die Aminosäureanalyse ergab: Hydrolyse 6n HCl, 20% TFA, 160° C, 1,5 h

	Ser	Glu	Ala	Gly	Cys	Val^{+}	Ile^{+}	Leu	Tyr
theor.:	2	4	3	1	4	2	1	2	1
gef.:	1,4	4	3	0,9	$^{++}$	1,4	0,5	2,3	1,1

$^{+}$ Hydrolyseresistenz Val-Ile $^{++}$ nicht bestimmt.

6.5. Gemeinsame Reduktion der Tetra-S-Benzyl-A-Kette mit der Dithiosulfat-B-Kette (57)

20,8 mg Tetra-S-Benzyl-A-Kette, 33,6 mg Dithiosulfat-B-Kette (aus Rinderinsulin) und 8 mg Acetamid werden in ca. 80 ml flüssigem NH_3 gelöst. Die Lösung wird mit flüssigem NH_3, in welchem wenig Natrium gelöst ist, titriert, bis die Blaufärbung ca. 90 sec bestehen bleibt. Durch Zugabe von NH_4Cl verschwindet die Färbung.
Das NH_3 wird bei RT bis auf etwa 200 ml abgedampft und der Rest wird lyophilisiert.

6.6. Rekombination der reduzierten Ketten

Eine Lösung des reduzierten Kettengemisches in 30 ml 0,05 m Phosphatpuffer pH 9 wird 15 h gegen verd. Ammoniak von pH 9 dialysiert. Die Außenflüssigkeit wird mehrmals gewechselt. Während der ganzen Zeit wird Sauerstoff in die Lösung geleitet. Nach der Gefriertrocknung wurden 46,9 mg Produkt erhalten.
40 mg dieses Produktes wurden in 3 ml 0,1m NH_4CO_3 gelöst und chromatographiert.

Säule : 2,5x50 cm Sephadex G25 medium in 0,1m NH_4CO_3
Elutionsmittel : 0,1m NH_4CO_3
Elutionsdiagramm : siehe Abb. 22

Abb. 22 Rekombinat

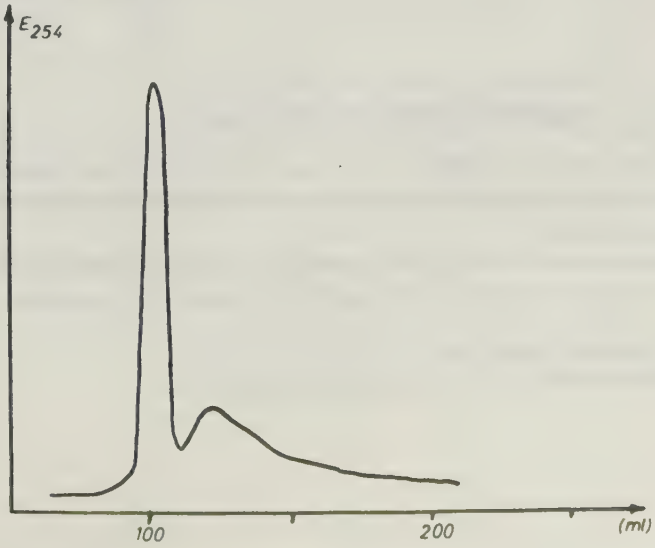
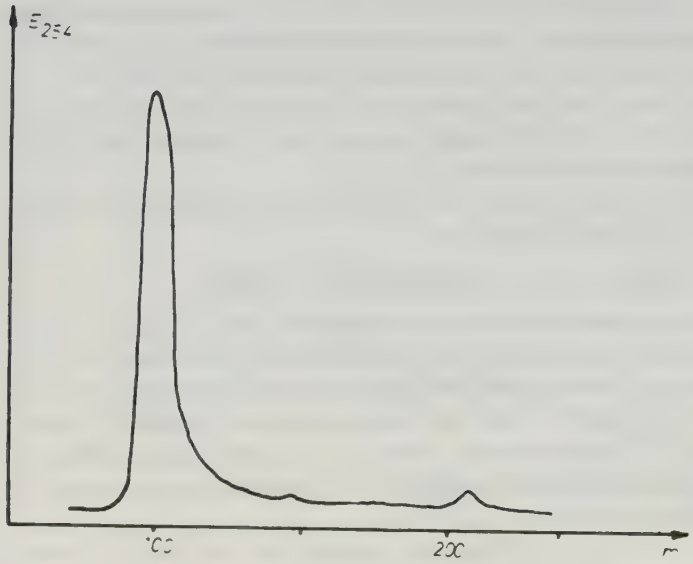


Abb. 22 nat. Rinderinsulin

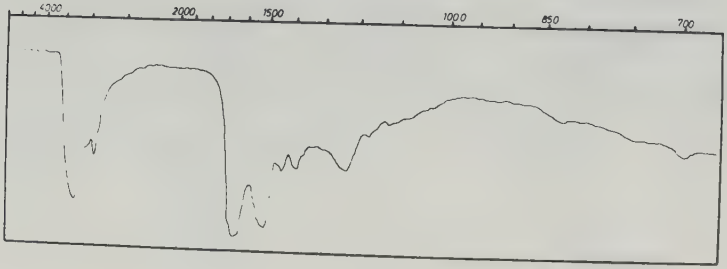


6.7. Charakterisierung des Rekombinats

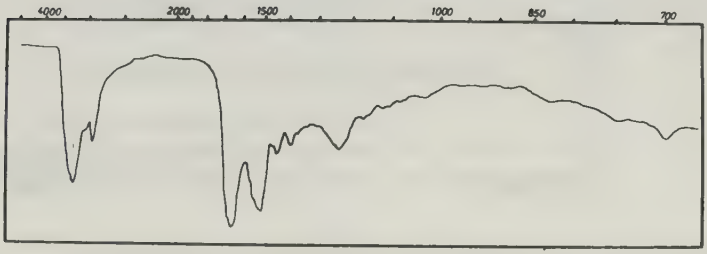
Das Rekombinat wurde IR-, UV-spektroskopisch und durch Niederspannungselektrophorese mit natürlichem Rinderinsulin verglichen.
Außerdem wurde die biologische Aktivität im Fettzellentest nach M. Rodbell (61) und A.J. Moody (62) geprüft.

IR-Spektrum (Abb. 23)
KBr-Pressling aus 1 mg Substanz/300 mg KBr

Abb. 23: IR-Spektren des Rekombinats und natürlichem Rinderinsulin.



Rekombinat



natürliches Rinderinsulin

Die IR-Spektren stimmen gut überein.

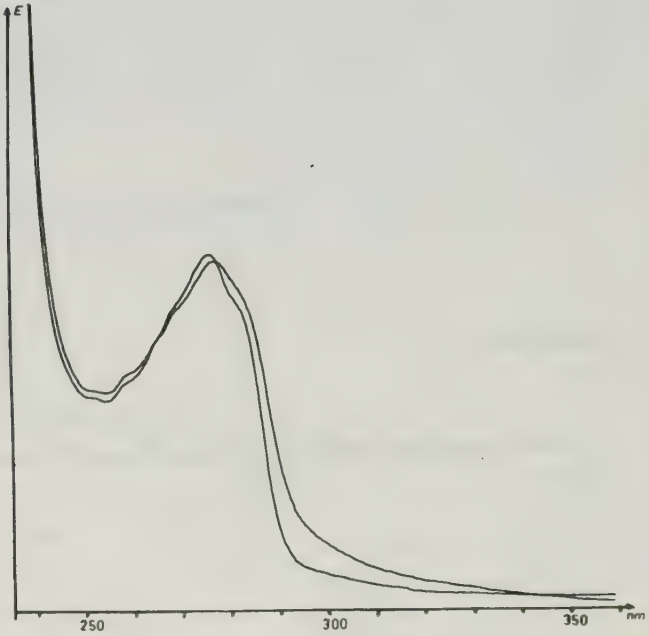
UV-Spektrum (Abb. 24)

d = 1 cm, c = 0,6 mg/ml 0,05 m $(NH_4)_2CO_3$

I = Rekombinat

II = Rinderinsulin

Abb. 24



Elektrophorese (Abb. 25)

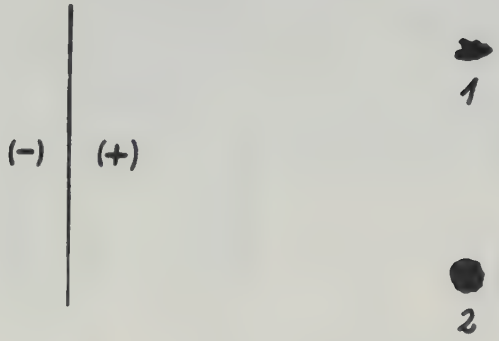
Spannung = 4,3 V/cm, Dauer 15 h, Laufmittel 4 m Harnstoff/
3 m Ameisensäure

Die Entwicklung erfolgte mit Pauly's Reagens.

Aktivitätstest.

Der Fettzellentest, aus technischen Gründen erst acht Wochen nach der Rekombination von der Fa. Hoechst durchgeführt, zeigte keine biologische Aktivität.

Abb. 25: 1 Rekombinat
2 Rinderinsulin



7. Synthese eines Pentapeptids der Sequenz H-His-Phe-Phe-Val-Gly-OH

7.1. Veresterung von PEG_3 mit Boc-Gly

Die Veresterung erfolgt analog V.6.1.
Einwaage = 21 g PEG_3, Ausbeute 17 g = 81 %
Beladung 73 %

7.2. Stufenweise Synthese des Peptids

Die Kupplungen und Abspaltungen erfolgen analog V.5.4. und 5.5. Die Synthese wurde in dem Synthesegerät nach dem Rotationskolbenprinzip durchgeführt.
Eine Übersicht über den Syntheseablauf geben Tabelle 3 und 4.

Tabelle 3: Syntheseplan

His	Phe	Phe	Val	Gly PEG_3
				Boc Gly + PEG_3
				Boc Gly PEG_3
			Boc Val + H	Gly PEG_3
			Boc Val	Gly PEG_3
		Boc Phe + H	Val	Gly PEG_3
		Boc Phe	Val	Gly PEG_3
	Boc Phe + H	Phe	Val	Gly PEG_3
	Boc Phe	Phe	Val	Gly PEG_3
$(Boc)_2$ His + H	Phe	Phe	Val	Gly PEG_3
$(Boc)_2$ His	Phe	Phe	Val	Gly PEG_3
H-His	Phe	Phe	Val	Gly PEG_3

Tabelle 4: Synthesebedingungen und Aminosäureanalysen

PEG_3	Gramm Polymer	Kupplung mit	Überschuß Anhydrid	Kupplung in ml Lsgm.	Fällung aus	Fällungs-mittel	Anzahl Fällungen
mono	15	Boc-Val	2	150/CH_2Cl_2	CH_2Cl_2	Et_2O	2
di		Boc-Phe	2	150/CH_2Cl_2	CH_2Cl_2	Et_2O/EtOH	2
tri		Boc-Phe	2	150/CH_2Cl_2	ETOH	Et_2O	2
tetra		$(Boc)_2His^+$	4	150/CH_2Cl_2	EtOH	Et_2O	2
penta	10						

+Es war eine Nachkupplung erforderlich.

Die Boc-Gruppe wurde in TFA abgespalten. Die TFA wurde abdestilliert, der Rückstand in Äthanol aufgenommen und mit Äther gefällt. Anzahl der Fällungen 3.

Aminosäureanalysen:
Hydrolyse 6n HCl, 110° C, 24 h

Peptid	Gly	Val		Phe		His	
		gef.	(theor.)				
mono	1						
di	1	0,97	(1)				
tri	1	0,93	(1)	1,04	(1)		
tetra	1	0,95	(1)	1,91	(2)		
penta	1	0,99	(1)	1,97	(2)	1,05	(1)

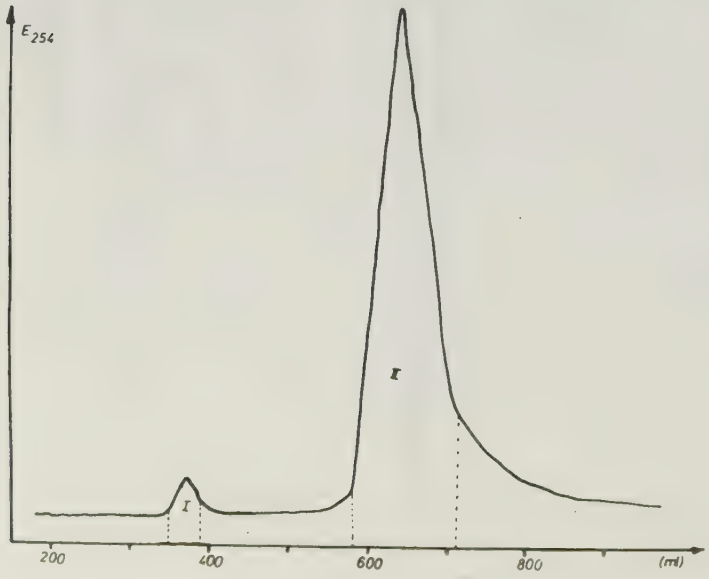
7.3. Alkalische Hydrolyse des Peptidesters

1 g des Polymerpeptids werden 20 ml 2n KOH 1 h verrührt. Die Lösung wird mit 1n HCl neutralisiert und mit dest. H_2O auf 300 ml verdünnt. Diese Lösung wird fünfmal mit $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird eingeengt und lyophilisiert.

Ausbeute Lyophilisat: 3,5 g
Das Lyophilisat enthält noch KCl, es wird an Sephadex LH20 gereinigt.

Säule : 5x100 cm Sephadex LH 20 in Methanol
Elutionsmittel : Methanol
Auftragmenge : 1 g Lyophilisat in 10 ml Methanol
Elutionsdiagramm: Siehe Abb. 26

Abb. 26: I PEG-Peptid
II Peptid



7.4. Charakterisierung des Peptids

Das Lyophilisat zeigte im Dünnschichtchromatogramm nur einen Fleck.
DC-Platte Kieselgel 60_{F254} Laufmittel A Rf = 0,42

Entwicklung der Platte erfolgte mit Fluram, Ninhydrin, Chlor-Tolidin . Mit Dragendorff-Bürger-Reagens war kein PEG nachweisbar.

Aminosäureananlyse:

Hydrolyse: 6n HCl, 110° C, 24 h

	Gly	Val	Phe	His
theor.	1	1	2	1
gef.	1	1,04	1,97	1,02

8. Synthese eines Tetrapeptids der Sequenz H-Ala-Leu-Gly-Ala-OH

8.1. Veresterung von PEG_6 mit Boc-Ala

Die Veresterung erfolgt analog V.6.1.
Einwaage 12 g PEG_6, Ausbeute 8,6 g = 72%
Beladung 75 %

8.2. Stufenweise Synthese des Tetrapeptids

Die Kupplungen und Abspaltungen erfolgen analog V.5.4. und 5.5.. Die Synthese wurde in dem 1. Prototyp des Synthesegerätes nach dem alternierenden Druckprinzip durchgeführt. Tabelle 5 und 6 geben Auskunft über das Syntheseschema und den Syntheseablauf.

Tabelle 5: Syntheseplan

Ala	Leu	Gly	Ala PEG_6
			Boc-Ala+PEG_6
			Boc-Ala-PEG_6
		Boc-Gly +	H—Ala-PEG_6
		Boc-Gly	Ala-PEG_6
	Boc-Leu +	H-Gly	Ala-PEG_6
	Boc-Leu	Gly	Ala-PEG_6
Boc-Ala +	H-Leu	Gly	Ala-PEG_6
Boc-Ala	Leu	Gly	Ala-PEG_6
H-Ala	Leu	Gly	Ala-PEG_6

Tabelle 6: Synthesebedingungen und Aminosäureananlysen

PEG_6	Gramm Polymer	Kupplung mit	Überschuß Anhydrid	Kupplung in	ml Lösungsm.	Dauer	Fäl-lungen	Boc-Abspaltung ml Lösungsmittel	Dauer	Fäl-lungen
Ala^4	6	Boc-Gly	4	CH_2Cl_2	60	3 h	2	70ml 1,2n HCl/HAc	40min	3
Gly^3		Boc-Leu	4	CH_2Cl_2	60	3 h	2	70ml 1,2n HCl/HAc	40min	3
Leu^2		Boc-Ala	4	CH_2Cl_2	60	3 h	2	70ml 1,2n HCl/HAc	40min	3
Gly^1	5,8g									

Aminosäureananlysen Hydrolyse 6n HCl, 110° C, 24 h

	Gly	Ala	Leu
mono		1	
di	1,02 (1)	1	
tri	0,99 (1)	1	1,05 (1)
tetra	0,97 (1)	2	0,95 (1)

8.3. Alkalische Hydrolyse des Peptidesters

3 g PP werden in 20 ml 0,5n NaOH 3 h gerührt und anschliessend mit 1n HCl neutralisiert. Die auf mit 200 ml H_2O verdünnte Lösung wird fünfmal mit $CHCl_3$ ausgeschüttelt.
Die wässrige Phase wird lyophilisiert.
Ausbeute: 690 mg Lyophilisat. Es enthält noch ca. 500 ml NaCl.
Das Lyophilisat wird an Sephadex LH20 getrennt.

Säule : 5 x 100 cm Sephadex LH 20 in Methanol
Elutionsmittel : Methanol
Auftragmenge : 690 mg in 10 ml Methanol
Elutionsdiagramm: Die einzelnen Fraktionen wurden auf Kieselgelplatten getüpfelt und mit Ninhydrin und Chlor-Tolidin entwickelt.

Die Peptidfraktion wurde eingeengt, mit H_2O aufgenommen und lyophilisiert.
Ausbeute: 45 mg = 16% bezogen auf das PP

8.4. Charakterisierung des Peptids

Die Peptidfraktion ergab dünnschichtchromatographisch nur einen Fleck (Laufmittel A).

ASA des Peptids

Hydrolyse: 6n HCl, 110° C, 24 h

	Gly	Ala	Leu
theor.	1	2	1
gef.	0,98	2	1,05

9. Synthese der Insulin-A-Kettensequenz Ala^{21}-Leu^{13}

9.1. Veresterung von PEG_{20} mit Boc-Ala

Die Veresterung erfolgt analog V.6.1.
Einwaage 30 g PEG; Ausbeute 27 g = 90 %
Beladung 81 %

9.2. Stufenweiser Aufbau des Peptids

Die Kupplungen und Abspaltungen erfolgen analog V.5.4. und 5.5.. Die Synthese wurde in dem 2. Prototyp des Synthesegerätes nach dem alternierenden Druckprinzip durchgeführt.
Eine Übersicht über das Syntheseschema und den Syntheseablauf geben die Tabelle 7 und 8.

Tabelle 7: Syntheseplan

Leu	Tyr	Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Ala	PEG_{20}
								Boc-Ala +	PEG_{20}
								Boc-Ala	PEG_{20}
							SIP		
							Boc-Cys + H-Ala		PEG_{20}
							SIP		
							Boc-Cys	Ala	PEG_{20}
						Bzl	SIP		
						Boc-Tyr + H-Cys		Ala	PEG_{20}
						Bzl	SIP		
						Boc-Tyr	Cys	Ala	PEG_{20}
						Bzl	SIP		
					Boc-Asn + H-Tyr		Cys	Ala	PEG_{20}
						Bzl	SIP		
					Boc-Asn	Tyr	Cys	Ala	PEG_{20}
				Bzl		Bzl	SIP		
				Boc-Glu + H-Asn		Tyr	Cys	Ala	PEG_{20}
				Bzl		Bzl	SIP		
				Boc-Glu	Asn	Tyr	Cys	Ala	PEG_{20}
				Bzl		Bzl	SIP		
			Boc-Leu + H-Glu		Asn	Tyr	Cys	Ala	PEG_{20}
				Bzl		Bzl	SIP		
		Boc-Gln + H-Leu		Glu	Asn	Tyr	Cys	Ala	PEG_{20}
				Bzl		Bzl	SIP		
		Boc-Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Ala	PEG_{20}
	Bzl			Bzl		Bzl	SIP		
	Boc-Tyr + H-Gln		Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Ala	PEG_{20}
	Bzl			Bzl		Bzl	SIP		
	Boc-Tyr	Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Ala	PEG_{20}
	Bzl			Bzl		Bzl	SIP		
Boc-Leu + H-Tyr		Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Ala	PEG_{20}
	Bzl			Bzl		Bzl	SIP		
Boc-Leu	Tyr	Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Ala	PEG_{20}
	Bzl			Bzl		Bzl	SIP		
H-Leu	Tyr	Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Ala	PEG_{20}

Tabelle 8: Synthesebedingungen

PEG_{20}	Gramm Polymer	Kupplung mit	Überschuß Anhydrid	Kupplung in	ml Lösungsm.	Dauer	Fällungen	Boc-Abspaltung ml Lösungsm.	Dauer	Fällungen
Ala^{21}	20	Boc-Cys(SIB)	8	CH_2Cl_2	150	4 h	3	150 TFA/CH_2Cl_2 1:1	40min	3
Cys^{20}	20,2	Boc-Tyr(Bzl)	8	CH_2Cl_2	150	4 h	2	150 TFA/CH_2Cl_2 1:1	40min	3
Tyr^{19}		Boc-Asn	8	CH_2Cl_2	150	4 h	3	150 TFA/CH_2Cl_2 1:1	40 min	3
Asn^{18}		Boc-Glu(Bzl)	8	CH_2Cl_2	150	4 h	2	150 TFA/CH_2Cl_2 1:1	40 min	3
Glu^{17}		Boc-Leu	8	CH_2Cl_2	150	4 h	2	150 TFA/CH_2Cl_2 1:1	40 min	3
Leu^{16}		Boc-Gln	8	CH_2Cl_2	150	4 h	2	150 TFA/CH_2Cl_2 1:1	40 min	3
Gln^{15}		Boc-Tyr(Bzl)	8	CH_2Cl_2	150	4 h	2	150 TFA/CH_2Cl_2 1:1	40 min	3
Tyr^{14}		Boc-Leu	8	CH_2Cl_2	150	4 h	2	150 TFA/CH_2Cl_2 1:1	40 min	3
Leu^{13}										

9.3. Alkalische Hydrolyse des Peptidesters

Wegen der nichtreproduzierbaren ASA-Werte des Hexa- und des Nonapeptids wurden Probeabspaltungen beider Peptide in 0,5 n NaOH vorgenommen.
Im Dünnschichtchromatogramm zeigte das Hexapeptid 6 und das Nonapeptid 9 Flecken (Laufmittel A, B und C).
Das Hydrolysat des Nonapeptids zeigte bei einer Trennung an Sephadex LH 20 ein nichtidentifizierbares Produktengemisch.

Säule : 2 x 100 cm Sephadex LH 20 in Methanol
Elutinsmittel : Methanol

Die vermutete Peptidfraktion hatte einen Fluorgehalt von 8,6 % F.
Nach dreimaliger Trennung an der gleichen Säule hatte die Fraktion noch einen Fluorgehalt von 5,1 %.
Die Synthese wurde an dieser Stelle abgebrochen.

10. Synthese eines Oktapeptids der Sequenz PEG_{20}-Ala-Met-Asn-Cys(SIP)-Tyr(Bzl)-Asn-Glu(Bzl)-Leu

10.1. Die Veresterung von PEG_{20} mit Boc-Ala

Die Veresterung erfolgt analog V.6.1.
Einwaage: 30 g PEG_{20}; Ausbeute: 26 g = 86 %
Beladung: 77 %.

10.2. Stufenweiser Aufbau des Peptids

Die Kupplungen und Abspaltungen erfolgten nach V.5.4. und 5.5.. Die Synthese erfolgte in dem 3. Prototyp des Synthesegeräts nach dem alternierenden Druckprinzip.
Einen Überblick über das Syntheseschema und den Syntheseverlauf geben die Tabellen 9 und 10.

Tabelle 9: Syntheseplan

Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn	Met	Ale	PEG_{20}
							Boc-Ala +	PEG_{20}
							Boc-Ala	PEG_{20}
						Boc-Met +	H-Ala	PEG_{20}
						Boc-Met	Ala	PEG_{20}
					Boc-Asn +	H-Met	Ala	PEG_{20}
					Boc-Asn	Met	Ala	PEG_{20}
				SIP				
				Boc-Cys +	H-Asn	Met	Ale	PEG_{20}
				SIP				
				Boc-Cys	Asn	Met	Ale	PEG_{20}
			Bzl	SIP				
			Boc-Tyr +	H-Cys	Asn	Met	Ale	PEG_{20}
			Bzl	SIP				
			Boc-Tyr	Cys	Asn	Met	Ala	PEG_{20}
			Bzl	SIP				
		Boc-Asn +	H-Tyr	Cys	Asn	Met	Ala	PEG_{20}
			Bzl	SIP				
		Boc-Asn	Tyr	Cys	Asn	Met	Ala	PEG_{20}
	Bzl		Bzl	SIP				
	Boc-Glu +	H-Asn	Tyr	Cys	Asn	Met	Ala	PEG_{20}
	Bzl		Bzl	SIP				
	Boc-Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Met	Ala	PEG_{20}
	Bzl		Bzl	SIP				
Boc-Leu +	H-Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn	Met	Ala	PEG_{20}
	Bzl		Bzl	SIP				
Boc-Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn	Met	Ala	PEG_{20}
	Bzl		Bzl	SIP				
H-Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn	Met	Ala	PEG_{20}

Tabelle 10: Synthesebedingungen

PEG	Gramm Polymer	Kupplung mit	Überschuß Anhydrid	Kupplung in	ml Lösungsm.	Dauer	Anzahl der Fällungen	Boc-Abspaltung ml Lösungsmittel	Dauer	Anzahl der Fällungen
Ala^8	20	Boc-Met	2	CH_2Cl_2	200	2 h	2	200 TFA	30min	3
Met^7		Boc-Asn	2	CH_2Cl_2	200	2 h	3	200 TFA	30min	3
Asn^6		Boc-Lys(SIP)	2	CH_2Cl_2	200	2 h	2	200 TFA	30min	3
Cys^5		Boc-Tyr(Bzl)	2	CH_2Cl_2/ DMF	100/100	2 h	2	200 TFA	30 min	3
Tyr^4		Boc-Asn	2	CH_2Cl_2/ DMF	100/100	2 h	3	200 TFA	30 min	3
Asn^3		Boc-Glu(Bzl)	2	CH_2Cl_2/ DMF	100/100	2 h	3	200 TFA	30min	3
Glu^2		Boc-Leu	2	CH_2Cl_2/ DMF	100/100	2 h	2	200 TFA	30min	3
Leu^1	19,5									

ASA

Hydrolyse: 6n HCl, 110° C, 24 h

		Asp	Glu	Ala	Cys	Met	Leu	Tyr
Tripeptid	theor.	1		1		1		
	gef.	0,85		1		0,76		
Hexapeptid	theor.	2		1	1	1		1
	gef.	2		1,21	0,32	0,85		0,22
Oktapeptid	theor.	2	1	1	1	1	1	1
	gef.	2	1,04	1,12	0,25	0,96	0,95	0,48

zu Tab. 10:

10.3. Die Bromcyanspaltung (63,74)

5 g PP und 50 g BrCN werden in 200 ml 80%-iger Ameisensäure gelöst und bei 48 h bei 40° C gerührt. Die Lösung wird bis zur Trockne eingeengt, in Methanol aufgenommen und wieder eingeengt. Dieser Vorgang wird noch einmal wiederholt um das BrCN zu vertreiben.
Der Rückstand wird in Wasser suspendiert und dreimal mit $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird lyophilisiert. Im Lyophilisat konnte abgespaltenes Peptid dünnschichtchromatographisch nur durch den Fluramtest nachgewiesen werden. Das Lyophilisat wurde an Sephadex LH 20 und an DEAE-Cellulose SS getrennt.
Säule: : 5 x 10 cm Sephadex LH 20 in Methanol
Elutionsmittel : Methanol
Auftragmenge : 1 g in 20 ml Methanol
Elutionsdiagramm: siehe Abb. 27

Abb. 27: Elutionsdiagramm
1 Polymerpeptid 2 HOBT

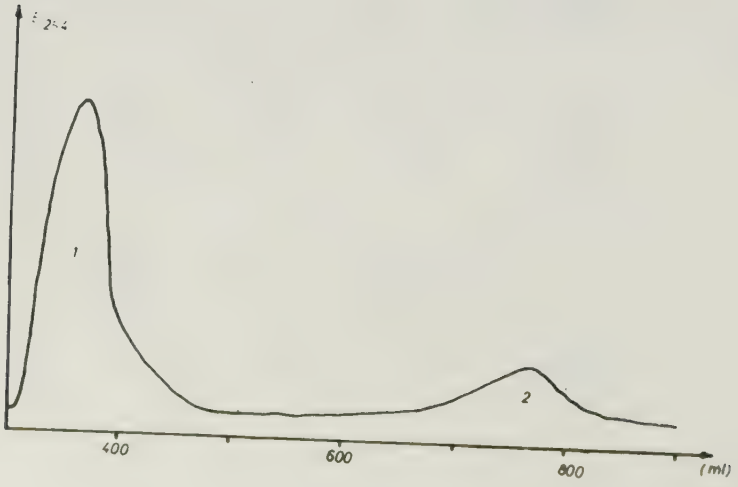
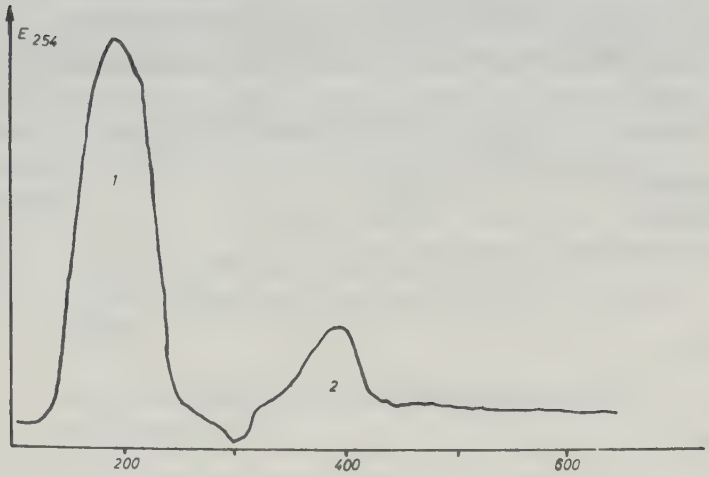


Abb. 28: Elutionsdiagramm

1 Polymerpeptid, 2 HOBT



Säule : 5 x 60 cm DEAE-Cellulose SS in 0,1 m $(NH_4)_2CO_3$

Elutionsmittel : 0,1 m $(NH_4)_2CO_3$

Auftragmenge : 1 g in 10 ml $(NH_4)_2CO_3$

Elutionsdiagramm: siehe Abb. 28

In den Fraktionen beider Trennungen konnte keine Peptid nachgewiesen werden.

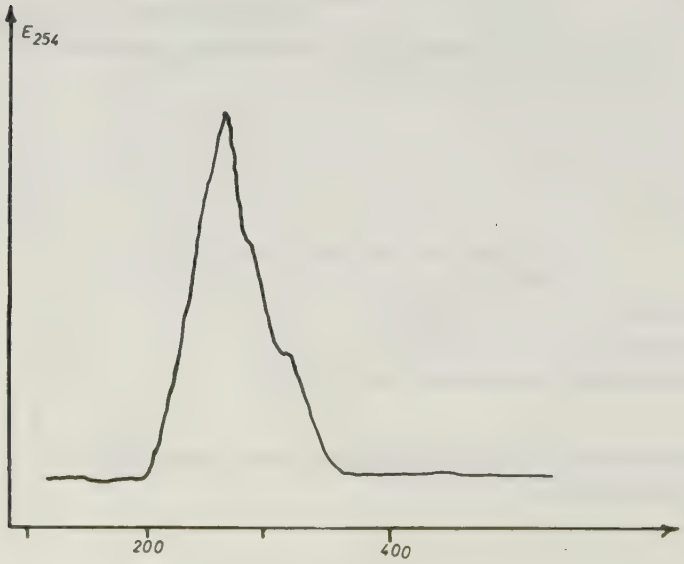
10.4. Alkalische Hydrolyse

5 g PP werden in 20 ml 2n KOH 3 h gerührt. Die Lösung wird mit 1n HCl neutralisiert und mit dest. H_2O auf 300 ml verdünnt. Diese Lösung wird mit $CHCl_3$ fünfmal ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird gefriergetrocknet.

1 g des Lyophilisats werden an DEAE-Cellulose aufgetrennt.

Säule : 5 x 60 cm DEAE-Cellulose SS in 0,1 m $(NH_4)_2CO_3$
Elutionsmittel : 0,1 m $(NH_4)_2CO_3$
Auftragmenge : 1 g in 10 ml $(NH_4)_2CO_3$
Elutionsdiagramm: siehe Abb. 29

Abb. 29



Im Lyophilisat ließ sich abgespaltenes Peptid nur in Spuren nachweisen. In den Fraktionen der säulenchromatographischen Trennung ließ sich kein Peptid nachweisen.

10.5. Hydrazinolyse

2 g PP werden in 20 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 5 ml Hydrazinhydrat 24 h gerührt. Die Lösung wurde einrotiert und in 20 ml Äthanol aufgenommen. Da sich in dieser Lösung dünnschichtchromatographisch Peptid nur in Spuren nachweisen ließ, wurde auf eine weitere Aufarbeitung verzichtet.

11. Synthese eines Tetrapeptids der Sequenz H-Gly-Phe-Val-Ala-OH an einer säurelabilen Ankergruppe

11.1. Synthese des Bis(p-Brommethylbenzoyl)-polyäthylenglykols

30 g PEG_{20} werden in 200 ml Toluol gelöst und mit dem 20-fachen Überschuß an p-Brommethylbenzoesäurechlorid 24 h am Rückfluß erhitzt. Das substituierte PEG wird mit Äther gefällt und noch zweimal aus CH_2Cl_2 mit Äther umgefällt. Anschließend wird der Niederschlag am Ölvakuum (10^{-1} Torr) getrocknet.

11.2. Veresterung der Ankergruppe mit Boc-Ala

25 g des Bis(p-Brommethylbenzoyl)-Polyäthylenglykol werden in 100 ml DMF mit dem 10-fachen Überschuß des Caesiumsalzes von Boc-Ala versetzt und 72 h unter Lichtausschluß gerührt. Das ausgefallene CsBr wird abfiltriert und das PP mit Äther gefällt. Der Niederschlag wird in CH_2Cl_2 aufgenommen und nochmals vom ausgefallenen CsBr abzentrifugiert. Aus der klaren Lösung wird das PP mit Äther gefällt und

noch zweimal aus CH_2Cl_2 mit Äther umgefällt.
Ausbeute: 19 g = 80 %
Beladung: 72 %

11.3. Stufenweiser Aufbau des Peptids

Die Kupplungen und Abspaltungen erfolgten analog V.5.4. und 5.5.. Die Synthese wurde in dem halbautomatisierten 3. Prototyp der Syntheseapparatur nach dem alternierenden Druckprinzip durchgeführt.
Eine Übersicht über das Syntheseschema und den Syntheseablauf geben Tabelle 11 und 12.

Tabelle 11: Syntheseplan

Gly	Phe	Val	Ala		PEG_{20}
				O Br-CH_2- -C-Cl +	PEG_{20}
				O Boc-Ala-Cs + Br-CH_2- -C	PEG_{20}
				O CH_2- -C	PEG_{20}
		Boc-Val + H-Ala		O CH_2- -C	PEG_{20}
	Boc-Phe + H-Val		Ala	O CH_2- -C	PEG_{20}
	Boc-Phe	Val	Ala	O CH_2- -C	PEG_{20}
Boc-Gly + H-Phe		Val	Ala	O CH_2- -C	PEG_{20}
Boc-Gly	Phe	Val	Ala	O CH_2- -C	PEG_{20}
H-Gly	Phe	Val	Ala	O CH_2- -C	PEG_{20}

Tabelle 12: Synthesebedingungen und Aminosäureananlysen

PEG_{20}	Gramm	Kupplung mit	Überschuß Anhydrid	Kupplung in	ml Lösungsm.	Dauer	Fäl-lungen	Boc-Abspaltung in ml Lösungsm.	Dauer	Fäl-lungen
Ala^4	12	Boc-Val	2	CH_2Cl_2	150	2 h	2	100 ml/TFA	30min	3
Val^3		Boc-Phe	2	CH_2Cl_2	150	2 h	2	100 ml /TFA	30min	3
Phe^2		Boc-Gly	2	CH_2Cl_2	150	2 h	2			
Gly^1	11,5		2							

ASA

	Gly	Ala	Val	Phe
Ala^4		1		
Val^3		1	0,96	
Phe^2		1	0,87	1,09
Gly^1	0,97	1	0,96	1,02

Hydrolyse: 6n HCl; 110° C; 24 h

11.4. Abspaltung des Peptids

5 g des PP werden in 100 ml Methanol und 3 ml HAc gelöst. Nach Zugabe von 0,5 g Palladium/Aktivkohle wird 24 h bei RT und 50 at hydriert. Anschließend wird der Katalysator abfiltirert und die Lösung bis zur Trocknung eingeengt. Der Rückstand wird in Wasser suspendiert, abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen.
Ausbeute nach Trocknung am Ölvakuum (10^{-1} Torr):
29 mg = 20%.

11.5. Charakterisierung des Peptids

Das Peptid ergab im Dünnschichtchromatogramm nur einen Fleck (Laufmittel A).

ASA

Hydrolyse: 6n HCl, 110° C, 24 h

	Gly	Ala	Val	Phe
theor.	1	1	1	1
gef.	0,95	1	0,92	1,07

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde bewiesen, daß der Bau einer automatischen Syntheseapparatur zur Liquid-Phase-Peptidsynthese möglich ist.
Es wurden zwei verschiedene Geräte entwickelt und konstruiert. Die bei Konstruktion und Betrieb der beiden Geräte aufgetretenen Probleme konnten weitgehend gelöst werden. Das Synthesegerät nach dem alternierenden Druckprinzip wurde soweit ausgebaut, daß zur Automation nur noch die Steuereinheit fehlt.

Durch die Synthese verschiedener Peptide in den Geräten konnten die Mängel der Systeme aufgedeckt und behoben werden.

Es wurde die variierte Ala^{21,18}-Insulin-A-Kette synthetisiert. Die ersten sieben Reaktionszyklen wurden in dem Rotationskolbensynthesegerät durchgeführt. Der weitere Aufbau der Insulin-A-Kette erfolgte manuell.
Die alkalische und saure Abspaltung der Schutzgruppen vom Heneicosapeptid verlief in sehr geringer Ausbeute. Wegen dieses Ergebnisses erfolgte die Rekombination der Tetra-S-Benzyl-A-Kette mit natürlicher B-Kette nach einem älteren Verfahren.
Das erhaltene Hybridinsulin zeigte in den IR- und UV-Spektren und der Niederspannungselektrophorese gute Übereinstimmung mit natürlichem Rinderinsulin. Im biologischen Test zeigte es jedoch keine signifikante Aktivität.
Als nächstes konnte in diesem Synthesegerät ein Pentapeptid in guter Ausbeute und Reinheit dargestellt werden.

In den drei Prototypen des Synthesegerätes nach dem alternierenden Druckprinzip wurden verschiedene Peptide dargestellt.
In dem ersten Prototyp dieses Gerätes wurde ein Tetrapep-

tid synthetisiert, isoliert und charakterisiert.
Die Synthese eines Nonapeptids in dem 2. Prototyp schlug fehl, da sich das Boc-Abspaltungsreagens, die Trifluoressigsäure, nicht quantitativ aus dem Niederschlag entfernen ließ.
Im 3. Prototyp wurde eine neue Ankergruppe am Polyäthylenglykol getestet. Ein Oktapeptid konnte in guter Ausbeute synthetisiert werden. Die Abspaltung und Isolierung des Peptids vom polymeren Träger mißlang, da die Polymer-Peptid-Bindung sterisch stark abgeschirmt ist.
Ein Tetrapeptid wurde in dem halbautomatisierten 3. Prototyp in guter Ausbeute synthetisiert, isoliert und charakterisiert.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1) M. Bodansky, V.J. du Vigeaud
J.Amer.Chem.Soc. 81, 2504 (1959)

2) R.B. Merrifield
J.Amer.Chem.Soc. 85, 2149 (1963)

3) J.M. Stewart, J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis
W.H. Freeman and Comp. San Francisco 1967

4) G. Losse, C. Madlung, P. Lorzenz
Chem.Ber. 101 (1968) 1257

5) N. Inukai, K. Nakano, M. Murakami
Bull.Chem.Soc. (Japan) 41 (1968) 182

6) C.G. Horvath, B.A. Preiss, S.R. Lipsky
Anal.Chem. 39 (1967) 1422

7) E. Bayer, E. Breitmaier, G. Jung, W. Parr
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 352 759 (1971)

8) G.P. Vlasow, A.Yu. Bilibin
Izv.Akad.Nauk. (UdSSR) Ser.Khim. 1969 1400

9) A. Loffet, I. Close
"Proc. 9th Europ.Peptide Symp." Orsay 1968,
North-Holland Publishing Comp. Amsterdam 1968, 189

10) K. Brunfeldt, J. Halstrøm,
"Proc. 9th Europ. Peptide Symp." Orsay 1968,
North-Holland Publishing Comp. Amsterdam 1968, 1964

11) G. Mansfeld, H. Hindriks, H.C. Beyersman
"Proc. 9th Europ. Peptide Symp." Orsay 1968,
North-Holland Publishing Comp. Amsterdam 1968, 197

12) H. Sugiyama, Y. Miura, Sh. Soto,
Yuki Gosei Kaguku Kyokai Shi. 26, 1968 1010

13) Kubodera, Toshiga, Hara, Tasuku, Makabo, Hidoki
Ger.Offen. 1.933.846, 1970

14) R.B. Merrifield, J.M. Stewart, N. Jernberg
USP. 3.531.258, 1970

15) A. Tometsko, I. Tischio, J. Garden,
J.Pharm.Sci. 1970 59 (11) 1655

16) R. Boni, G.M. Bonira, L. Ciceri, A. Gambini,
A. Scatturin, E. Scoffone,
Chim.Ind. 1971, 53 (1) 10

17) K. Brunfeldt, P. Roepsdorff, J. Halstrøm,
USP. 3.557.077, 1971

18) C. Birr
Ger.Offen. 2.017.351, 10 Apr. 1970

19) V. Hruby, L. Barstow, Th. Linhart
Anal.Chem. 1972 (2), 343

20) W.K. Park, D. Regoli,
Can.J.Biochem. 1972 50 (7) 755

21) W.K. Park, D. Regoli
USP. 3.715.190, 1973

22) W. Voelter, K. Zech, N. Grubhofer
Z.Naturforsch. Teil B 1973 28 (9-10) 625

23) E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W.A. König,
P.P. Brüning, H.P. Hagenmaier, W. Parr
J.Amer.Chem. Soc. 92, 1735 (1970)

24) B. Gutte, R.B. Merrifield
J.Am.Chem.Soc. 91 (1969) 501

25) R.L. Letsinger, M.J. Kornet,
J.Am.Chem.Soc. 85 (1962) 3045

26) R.L. Letsinger et.al.
J.Am.Chem.Soc. 86 (1964) 5163

27) M. Fridkin, A. Patchornik, E. Katachalski
J.Am.Chem.Soc. 88 (1966) 3164

28) M.M. Shemyakin, Ya Ovchinnikov, A.A. Kiriuschkin,
I.V. Kozhevnikova
Tetrahedron Letters 2323 (1965)

29) M. Mutter, E. Bayer, H.P. Hagenmaier
Angew.Chem. 83 833 (1971)

30) E. Bayer, M. Mutter
Nature 237, 512 (1972)

32) M. Mutter,
Dissertation Universität Tübingen 1972
33) M. Schattenberg,
Diplomarbeit Universität Tübingen
34) E. Bayer, M. Mutter, R. Uhmann, J. Polster, H. Mauser
J.Am.Chem.Soc. 96 (1974) 7333
35) R. Eberle
unveröffentlichte Ergebnisse
36) I. Gatfield
Dissertation Universität Tübingen 1975
37) H. Albrecht
Dissertation Universität Tübingen 1978
38) H. Frank, H. Hagenmaier
Experientia 31, 131 (1975)
39) H. Frank. H. Meyer, H.P. Hagenmaier
Chemikerzeitung 101 (1977)
40) E. Bayer, M. Mutter, G. Holzer
Proc. of the Fourth American Peptide Symposium
Ann Arbour Science Publishers Inc.
41) F. Sanger, L.F. Smith
Endeauvor 16 48 (1957)
42) F. Sanger
Biochem. J. 45, 563 (1949)
43) A. Ryle, F. Sanger, L.F. Smith, R. Kitai
Biochem. J. 60 541 (1955)
44) D.C. Hodkin et.al.
Nature 224 491 (1969)
45) D.F. Steiner, P.E. Oyer,
Proc.Nat.Acad.Sci. 157 473 (1967)
46) D.F. Steiner, D. Cunningham, L. Spigelman, B. Aten
Science 157 697 (1967)
47) R.E. Chance, R.M. Ellis, W.W. Bromer
Science 161 165 (1967)
48) D.F. Steiner, J.L. Clark
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 60, 622 (1968)

49) P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Jolh,
B. Rimiker, W. Rittel
Helv.Chim.Acta 57 2617 (1974)
50) J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Brenner, O. Brinkhoff,
R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermaier, D. Brandenburg,
T. Okuda, H. Zahn
Z.Naturforsch. 18b 1120 (1963)
51) P.G. Katsoyannis, A. Tometsko, K. Fuka
J.Amer.Chem.Soc. 85 2863 (1963)
52) Y. Kung
Sci. Sinica 19 1710 (1965)
53) H. Zahn
Naturwissenschaften 54 396 (1967)
54) A. Marglin, R.B. Merrifield
J.Amer.Chem.Soc. 85 2149 (1963)
55) U. Weber et.al.
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 348 1715 (1967)
56) U. Weber, M. Andre
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 356 701 (1975)
57) H. Zahn, H. Bremer, R. Zabel
Z.Naturforsch. 20b 653(1965)
58) U. Weber, K. Herzog, H. Grossmann, P. Hartter,
G. Weitzel
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 352 701 (1975)
59) H.P. Hagenmaier, H. Frank
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 353 1973 (1972)
60) B.W. Ericson, R.B. Merrifield
J.Amer.Chem.Soc. 95 3750 (1973)
61) M. Rodbell
J.Biol.Chem. 239 375 (1964)
62) A.J. Moody
Horm.Metab.Res. 6 12, (1974)
63) E. Groß
Meth.Enzymol. 11 238 (1967)
64) E. Groß, B. Witkop
J.Biol.Chem. 237 1956 (1962)

65) W. Busse, F. Carpenter
J.Amer.Chem.Soc. 96 5947 (1974)
66) R. Ambler
Meth.Enzymol. 14 155 (1970)
67) L. Carpino
J.Amer.Chem.Soc. 81 955 (1959)
68) W. König. R. Geiger
Chem.Ber. 103 955 (1970)
69) A. Nietzky, G. Braunschweig
Chem.Ber. 27 3381 (1894)
70) E. Müller, G. Zimmermann
J.Prakt.Chem. III 293, 284 (1925)
71) E. Schnabel
Liebigs Ann.Chem. 702 188 (1967)
72) U. Weber, P. Hartter
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 351 1384 (1970)
73) J.L. Wood, V. du Vigneaud
J.Biol.Chem. 130 109 (1939)
74) S. Guttmann, R.A. Boisonnas
Helv.Chim.Acta 41 1964 (1958)
75) J.S. Morley
J.Chem.Soc. 2410 (1967)
76) S. Moore, D.H. Spackmann, W.H. Stein
Anal.Chem. 30 1185 (1958)
77) E. Merck, Anfärbereagenzien für die DC und Papierchromatographie, Darmstadt
78) A. Felix, M.H. Jiminez
J.Chromat. 89 361 (1974)
79) W. Woiwode
Dissertation Universität Tübingen 1977
80) E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W. König, W. Brüning, H. Hagenmaier, W. Parr
J.Amer.Chem.Soc. 92, 1735 (1970)
81) E. Bayer, E. Breitmaier, G. Jung, W. Parr
2nd Amer. Peptide Sympos., Cleveland 1970

82) E. Bayer, H. Hagenmaier, W. Parr, H. Eckstein, G. Jung, P. Hunziker, R. Sievers
Proc. 10th Europ. Peptide Symp. Padua 1969.
North-Holland Publishing Comp., Amsterdam 1971, 65

83) C.H. Li, D. Yamashiro
J.Amer.Chem.Soc. 92 (1970) 7608

84) H.D. Niall
Nature New Biology 230 (1971) 90

85) C.H. Lid, D. Yamashiro, S. Lemaire
Biochem. 14, 5 (1975) 953

86) IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 348 (1967) 245;
J.Biol.Chem. 247 (1972) 977

LEBENSLAUF

Ulrich Heitmann

21.12.1946	geboren in Beckum/Nordrheinwestfalen
1953-1957	St.Jacobus-Volkschule in Ennigerloh
1957-1963	Real- und Rektoratsschule Ennigerloh
Ostern 1963	Prüfung der mittleren Reife
1963-1965	Ausbildung zum Baustoffprüfer bei der Fa. Polysius GmbH in Neubeckum
Sept. 1965	Lehrabschlußprüfung
1965-1969	Ausbildung zum Chemieingenieur (grad) an der Naturw.-Techn.-Akademie Isny/Allgäu
Mai 1969	Ingenieurexamen
Mai 1969 - Sept. 1969	Forschungsarbeit bei der Fa. Polysius AG Neubeckum
8.Sept. 1969	Prüfung zur eingeschränkten Hochschulreife am Kultusministerium Stuttgart
1969-1975	Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
April 1975	Abschluß Diplom
Mai 1975 - Nov. 1977	Experimenteller Teil der Doktorarbeit: Entwicklung, Aufbau und Anwendung einer Syntheseapparatur für die Liquid-Phase-Peptidsynthese am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

E. Bayer, W. Braun, E. Breitmaier, G. Häfelinger, R. Hamm, H. Hagenmaier, M. Hanack, S. Kemmler-Sack, D. Krug, H. Krüger, G. Kortüm, W. Kraus, E. Lindner, I.-P. Lorenz, H. Mauser, E. Müller, B. Oelkrug, G. Opitz, H. Pauschmann, A. Rieker, W. Rundel, W. Rüdorff, F. Seelig, H. Stegmann, H. Suhr, E. Stumpp, W. Voelter, W. Zeil.

Dissertationsdruck
GmbH & Co. KG.
M. SCHADEL
86 Bamberg · Hohe-Kreuz-Str. 9b · Tel. 0951/5 44 14